

**Molekulare Analyse der epigenetischen Regulation der *SMN2*-
Genaktivität in der Pathogenese der spinalen Muskelatrophie (SMA)**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Jan Henning Hauke

aus Düsseldorf

Köln

2009

Berichtersteller/in: Prof. Dr. Brunhilde Wirth
Prof. Dr. Jürgen Dohmen

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 24.11.2009

meiner Familie
für Verena und Jonas

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	5
2	Einleitung	9
2.1	Epigenetische Regulation der Genexpression	9
2.2	DNA-Methylierung	10
2.3	Methylierung und Transkription.....	12
2.4	DNA-Methylierung und Erkrankungen	14
2.5	DNA-Methyltransferase Inhibitoren.....	15
2.6	Histon-Acetylierung.....	15
2.7	HDAC-Inhibitoren.....	17
2.8	Die spinale Muskelatrophie	20
2.9	Die genetische Ursache der SMA.....	21
2.9.1	Die <i>survival motor neuron</i> Gene (<i>SMN1</i> , <i>SMN2</i>)	21
2.9.2	Mutationen des <i>SMN1</i> -Gens.....	23
2.9.3	Expression und Prozessierung der <i>SMN</i> -Primärtranskripte.....	24
2.9.4	Das <i>SMN</i> -Protein	25
2.10	Der Promotor der <i>SMN</i> -Genkopien.....	27
2.11	SMA modifizierende Gene/Proteine.....	30
2.12	<i>SMN2</i> als Zielgen der SMA-Therapie	31
2.13	Histondeacetylase-Inhibitoren zur Therapie der SMA.....	31
2.14	Alternative Therapieansätze zur Behandlung der SMA	33
2.15	Zielsetzung der Arbeit.....	36
3	Material und Methoden	37
3.1	Chemikalien und Materialien.....	37
3.1.1	Testsubstanzen	37
3.1.2	Materialien	37
3.1.3	Verwendete Kits.....	40
3.1.4	Verwendete Vektoren	41
3.1.5	Verwendete Enzyme.....	41
3.1.6	Verwendete Geräte.....	41
3.1.7	Lösungen und Puffer	43
3.1.8	Verwendete Antikörper	45

3.1.9	Die verwendeten Oligonukleotidstartermoleküle (Primer)	45
3.1.10	Verwendete Internetadressen/Software	54
3.1.11	Verwendete Zelllinien	54
3.1.12	Verwendete DNAs aus Blutproben.....	55
3.1.13	Biologisches Material	57
3.1.14	SMA-Mausmodelle und murine Zelllinien.....	57
3.2	Methoden.....	58
3.2.1	Organotypische, hippokampale Hirnschnittkulturen des Menschen.....	58
3.2.2	DNA-Isolation aus Blutproben von SMA-Patienten.....	59
3.2.3	Zellkultur	59
3.2.4	Isolation von DNA	62
3.2.5	Isolation von RNA	62
3.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	63
3.2.7	Amplifikation von Nukleinsäuren (Polymerase-Kettenreaktion, PCR)	63
3.2.8	Bisulfitbehandlung von genomischer DNA.....	64
3.2.9	Quantifizierung der DNA Methylierung mittels Pyrosequenzierung	65
3.2.10	Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels Sequenzierung	66
3.2.11	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	67
3.2.12	Quantitative <i>real-time</i> PCR mit SYBR Green	67
3.2.13	Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese	69
3.2.14	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	70
3.2.15	Methyltransferaseaktivitätstest.....	71
3.2.16	Transfektion eukaryotischer Zellen	72
3.2.17	Luziferaseassay	73
3.2.18	Transfektion mit siRNAs.....	74
3.2.19	EMSA	74
3.2.20	<i>In vitro</i> Methylierung von DNA.....	76
3.2.21	Überprüfung der DNA-Methylierung mittels BstUI Verdau	76
3.2.22	Klonierung des <i>SMN</i> -Minimalpromotors nach Restriktionsverdau	77
3.2.23	Proteinanalyse	77
3.2.24	Datenauswertung.....	82
4	Eigene Vorarbeiten	83
5	Ergebnisse	86
5.1	Promotoraktivitätstests.....	86

5.2	Methylierungsanalysen	93
5.2.1	<i>SMN2</i> -Promotormethylierung in den Fibroblastenzelllinien ML5 und ML1693	
5.2.2	Die Methylierung des <i>SMN2</i> -Promotors korreliert in Blutproben von SMA-Patienten mit 2 <i>SMN2</i> -Kopien mit dem Schweregrad der Erkrankung	95
5.2.3	Die Methylierung des <i>SMN2</i> -Gens in SMA-Fibroblasten korreliert ebenfalls mit dem Schweregrad der Erkrankung.....	99
5.2.4	Die Aktivität der Methyltransferasen korreliert in SMA-Fibroblasten mit dem Schweregrad der Erkrankung	103
5.2.5	Methylierung des <i>SMN1</i> -Gens ist nicht ursächlich für die SMA	104
5.2.6	Vergleich der <i>SMN1</i> - und <i>SMN2</i> -Methylierung	105
5.2.7	Die Methylierung des <i>SMN2</i> -Gens in diskordanten Familien zeigt keine Korrelation mit dem Phänotyp.....	106
5.3	<i>LT-SMN2</i> Expressionsanalysen nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren	108
5.4	Analyse der <i>SMN</i> -Expression in OHSCs nach der Behandlung mit HDAC-Inhibitoren	117
5.5	HDAC-Inhibitoren führen nicht zu einer Demethylierung des <i>SMN2</i> -Promotors	121
5.6	Das Methylierungsmuster des <i>SMN2</i> -Transgens in Mäusen unterscheidet sich vom dem des humanen <i>SMN2</i> -Gens	124
5.7	Die Behandlung mit SAHA führt nicht zu einer Demethylierung des <i>Smn</i> -Gens	127
5.8	Methylierung des <i>SMN2</i> -Transgens in verschiedenen Geweben der Hung SMA-Mäuse	128
5.9	Die Expression des <i>LT-SMN2</i> ist in neuronalem Gewebe deutlich erhöht	131
5.10	Expression des <i>LT-SMN</i> Transkripts in humanem embryonalem Gewebe.....	133
5.11	Analyse der Promotorregion in der Umgebung der 1. Transkriptionsstartstelle	134
5.12	Nachweis eines sequenzspezifisch bindenden Proteinkomplexes durch EMSA-Analysen.....	135
5.13	Das <i>Silencing</i> der <i>LT SMN2</i> Transkription mittels DNA-Methylierung wird durch MeCP2 vermittelt	138
6	Diskussion.....	148
6.1	Die Aktivität des <i>SMN</i> -Minimalpromotors wird durch DNA-Methylierung reduziert.....	148
6.2	Das ^{<i>SMN</i>} CGI 2 ist funktionell relevant für die Expression der <i>SMN</i> -Genkopien	149

6.3	Die Methylierung des ^{SMN} CGI 2 korreliert mit dem Schweregrad der SMA	150
6.4	Die phänotypischen Unterschiede in diskordanten SMA-Familien sind nicht auf Unterschiede in der Methylierung des ^{SMN2} CGI 2 zurückzuführen	152
6.5	Die Erkrankung von Patienten mit einer Deletion des <i>SMN2</i> -Gens ist nicht auf eine Hypermethylierung des ^{SMN1} CGI 2 zurückzuführen.....	153
6.6	Die Expression vom 1. Transkriptionsstartpunkt des <i>SMN2</i> -Gens wird durch Methylierung gehemmt	154
6.7	Die <i>LT-SMN2</i> Expression ist in neuronalem Gewebe erhöht.....	155
6.8	Das <i>SMN2</i> „Gene Silencing“ durch DNA-Methylierung kann durch HDAC-Inhibitoren umgangen werden	156
6.9	HDAC-Inhibitoren haben nur geringen Einfluss auf die Methylierung des <i>SMN2</i> -Promotorbereichs	157
6.10	Die Inhibition der <i>LT-SMN2</i> Expression wird durch MeCP2 vermittelt	158
6.11	Der <i>knock-down</i> einzelner Histondeacetylasen reicht nicht aus, um die Expression vom ersten Transkriptionsstartpunkt zu steigern.....	159
7	Zusammenfassung.....	161
8	Abstract.....	164
9	Publikationsverzeichnis.....	166
9.1	Originalarbeiten:	166
9.2	Übersichtsartikel:	166
9.3	Eingereichte Arbeiten.....	166
9.4	Kongressbeiträge.....	167
10	Literaturverzeichnis.....	168
11	Danksagung.....	181
12	Anhang	182
12.1	Abbildungen.....	182
12.2	Abkürzungsverzeichnis	191
12.3	Erklärung	194

2 Einleitung

2.1 Epigenetische Regulation der Genexpression

Die Expression der Gene in eukaryotischen Zellen ist sowohl zeitlich als auch räumlich genau reguliert. Dies gilt sowohl während der Differenzierung und Entwicklung, als auch während des Zellzyklus oder für Zellen die nicht mehr teilungsaktiv sind. Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen die Transkriptionsfaktoren. Diese Proteine können in den Promotorregionen eukaryotischer Gene, welche sich meistens über etwa 500 bp bis einige kb stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt des jeweiligen Gens befinden, spezifische Sequenzen erkennen und an diese binden. Durch die Rekrutierung weiterer Proteine wird so die Bindung der RNA-Polymerase begünstigt oder gehemmt, was zu einer Steigerung bzw. Repression der Expression der Gene führt. Die Aktivität eines Gens bzw. seines Promotors hängt demzufolge von der DNA-Sequenz der Promotorregion im 5'Bereich eines Gens ab. Neben den Transkriptionsfaktoren bzw. deren Bindungsstellen regulieren weitere Motive und Faktoren die Expression eukaryotischer Gene. So enthalten viele Gene auch weiter von der Promotorregion entfernt liegende cis-regulatorische Sequenzen, die Einfluss auf die Transkription haben. Außerdem kann der 3'untranslatierte Bereich eines Gens Bindestellen für microRNAs enthalten. Werden nun Transkripte von diesem Gen gebildet, die miRNA Bindestellen enthält, so können miRNAs an diese binden und die Translation der RNA hemmen oder zu ihrem Abbau führen und so die Aktivität des entsprechenden Gens regulieren. Es gibt in eukaryotischen Zellen jedoch eine weitere Ebene der Genregulation, die nicht unmittelbar von der DNA-Sequenz abhängig ist. Diese Mechanismen werden als epigenetische Mechanismen der Genregulation bezeichnet. Die Epigenetik befasst sich im Allgemeinen mit der Vererbung von Merkmalen, die nicht durch die codierende DNA-Sequenz an sich festgelegt sind, sondern durch diese epigenetischen Modifikationen der DNA oder des Chromatins auftreten. Im Folgenden werden die beiden wichtigsten Mechanismen der epigenetischen Regulation der Genexpression (DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung) näher erläutert.

2.2 DNA-Methylierung

Sowohl die DNA von Prokaryonten als auch die von Eukaryonten enthält neben den vier bekannten Nukleotiden in geringem Maße auch sogenannte modifizierte Basen. In Eukaryonten findet man fast ausschließlich die Übertragung einer Methylgruppe auf Cytosinreste, die bereits in die DNA eingebaut sind. Das so entstandene Nukleotid wird als 5-Methyl-Desoxycytidin bezeichnet und man spricht von DNA-Methylierung. Diese Modifikation tritt in Säugetieren ausschließlich in CpG-Dinukleotiden auf und wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert (Bird 1992). Die DNA-Methyltransferasen übertragen eine Methylgruppe des universellen Methylgruppendonors S-adenosyl-L-methionin (SAM) auf das Kohlenstoffatom an Position 5 des Cytosins. Dabei findet man eine symmetrische Methylierung beider DNA-Stränge (Riggs, et al. 1983). Diese DNA-Modifikation kann nicht in allen eukaryotischen Organismen gefunden werden, so zeigen die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und viele Invertebraten wie der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* keine Cytosin-Methylierung. In Insekten wurden niedrige Methylierungswerte für die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gefunden, während in der Honigbiene *Apis mellifera* deutlich mehr modifizierte Cytosinbasen nachgewiesen werden konnten (Wang, et al. 2006).

Die CpG-Dinukleotide, an denen Methylierung erfolgen kann, sind im Genom der Säugetiere nicht zufällig verteilt, sondern treten in Form von spezifischen Mustern auf. Daher spricht man auch von Methylierungsmustern. Es werden zwei Formen der Methylierung unterschieden. Die „Maintenance“-Methylierung sorgt für die Aufrechterhaltung bestehender Methylierungsmuster nach der Zellteilung und der damit verbundenen Replikation der DNA. Als „de novo“-Methylierung bezeichnet man die Modifikation von DNA, die auf beiden Strängen nicht methyliert ist. In menschlichen somatischen Zellen liegen etwa 70-80% aller Cytosine in CpG-Dinukleotiden methyliert vor, dies entspricht etwa nur 1% aller Cytosinreste. Obwohl nur ein geringer Anteil der Cytosine methyliert ist, hat diese Modifikation Einfluss auf die Chromatinstruktur und die Genexpression (Razin, et al. 1991). Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung von „fremder“ DNA, beispielsweise bei der Infektion eukaryotischer Zellen mit Viren (Sutter, et al. 1980). Zudem ist die DNA-Methylierung maßgeblich an der X-chromosomalen Inaktivierung beteiligt (Panning, et al. 1996). Dabei wird die Expression des X-chromosomalen Xist (*X inactive specific transcript*) Gens, dessen

Produkt die nicht kodierende Xist RNA ist, welche dann in cis an das später inaktive X-Chromosom (Xi) bindet durch Hypomethylierung ermöglicht. Auf dem später aktiven X-Chromosom (Xa) hingegen ist die Expression der Xist RNA durch DNA-Methylierung im Promotor des Xist Gens reduziert. Neuere Untersuchungen zeigen zudem, dass DNA-Methylierung Einfluss auf die Stabilität des Genoms hat, indem sie Schutz vor mobilen Elementen (z.B. Alu Elementen) bietet, die durch Methylierung abgeschaltet werden (Kato, et al. 2003, Rollins, et al. 2006).

CpG-Dinukleotide sind nicht gleichmäßig über das Genom verteilt, sondern kommen häufig in so genannten CpG-Inseln vor. Als CpG-Inseln gelten Bereiche des Genoms, die einen erhöhten Anteil von 55-70% an Desoxycytidin und Desoxyguanosin gegenüber 40% im übrigen Genom aufweisen und eine Länge von etwa 200 bis 1000 bp haben. Dass sich die CpG-Inseln häufig in Promotornähe befinden, unterstreicht ihre Bedeutung für die Transkription (Bird 1986, Craig, et al. 1994). Circa 70% aller menschlichen Gene weisen CpG-Inseln im Promotorbereich auf (Weber, et al. 2007). Die Desoxycytidinreste in CpG-Inseln von Genen, die gewebespezifische exprimiert werden, sind oft durch Methylierung modifiziert, während die CpG-Inseln vor Haushaltsgenen, sofern vorhanden, meist unmethyliert sind (Brandeis, et al. 1994, Eckhardt, et al. 2006, Weber, et al. 2007).

Die DNA-Methylierungsmuster ändern sich während der Embryonalentwicklung stark. Nach der Befruchtung der Eizelle kommt es zu einer beinahe vollständigen Demethylierung des Genoms. Anschließend folgen im Blastocystenstadium Wellen der „de novo“-Methylierung. Dabei werden oft die zuvor gelöschten Methylierungsmuster wieder hergestellt (Razin, et al. 1984). Wie dieser Mechanismus funktioniert, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Dennoch gibt es heute zahlreiche Hinweise, dass bestimmte Methylierungsmuster, die funktionelle Unterschiede bedingen, auf die nächste Generation weitervererbt werden können. So konnte für den *agouti* Locus in der Maus gezeigt werden, dass die Expression des Gens von der variablen und vererbaren Methylierung eines zum Promotor proximalen *Repeats* abhängig ist (Morgan, et al. 1999). Auch für die Gene *MLH1* und *MSH1* konnte gezeigt werden, dass vererbare Veränderungen der Methylierung (Epimutationen) das Risiko erhöhen an Krebs zu erkranken (Chan, et al. 2006, Suter, et al. 2004).

Die Aufrechterhaltung eines spezifischen Methylierungsmusters scheint für die Zelle von entscheidender Bedeutung zu sein, da hierfür eine erhöhte Mutationsrate in Kauf

genommen wird. Das 5'-CG-3' Dinukleotid tritt im Genom weniger häufig auf, als statistisch zu erwarten wäre (Cooper, et al. 1989). Die Ursache liegt vermutlich in der erhöhten Mutationsrate in diesen Sequenzen. Es kommt unter physiologischen Bedingungen recht häufig zur Desaminierung von Desoxycytidin zu Desoxyuridin. Das Desoxyuridin kann durch die Uridin-DNA-Glykosylase (UDG) erkannt und ein Bereich aus dem fehlerhaften Strang ausgeschnitten werden. Die Neusynthese des Stranges durch das Reparatursystem stellt dann das ursprüngliche Desoxycytidin wieder her. Die Desaminierung von 5-Methyl-Desoxycytidin hingegen führt zur Bildung von Desoxythymidin, welches normalerweise auch in der DNA vorhanden ist. Daher wird diese Mutation durch die Thymidin-DNA-Glykosylase und das Reparatursystem nur schwer erkannt. Es kommt verstärkt zu C nach T Transitionen (Jiricny 1996, Lutsenko, et al. 1999). Dies führt im Bereich von methylierten CpG-Dinukleotiden häufiger zu Punktmutationen und zum Verlust von 5'-CG-3' Dinukleotiden. Da trotzdem noch CpG-Dinukleotide vorhanden sind, müssen sie für die Zelle von besonderer Bedeutung sein. Wie wichtig die Aufrechterhaltung bestehender Methylierungsmuster ist, konnte anhand von Tiermodellen gezeigt werden. Die gezielte Mutation der DNA-Methyltransferase 1, die zu einem Funktionsverlust des Enzyms führt, bewirkt einen embryonal letalen Phänotyp (Li, et al. 1992).

2.3 Methylierung und Transkription

Die Methylierungsmuster von spezifischen DNA-Abschnitten weisen zwischen den Zelltypen/Geweben nur geringe Unterschiede auf. Auch der Vergleich der Methylierung spezifischer Sequenzen zwischen Individuen zeigt große Ähnlichkeit der Methylierungsmuster (Doerfler, et al. 1990, Eckhardt, et al. 2006). Der Einfluss des Alters eines Individuums auf die Methylierung wird zum Teil kontrovers diskutiert, unterschiedliche Analysemethoden führten hier zu gegensätzlichen Ergebnissen. So konnten Eckhardt et. al in ihrer Untersuchung keinen Einfluss des Alters auf die DNA-Methylierung feststellen, während die Untersuchungen von Fraga et al. an monozygoten Zwillingen zu dem Ergebnis kommen, dass sich nach mehreren Jahrzehnten epigenetische Unterschiede zwischen den untersuchten Geschwistern manifestieren und die DNA-Methylierung zunimmt (Fraga, et al. 2005).

Die Methylierung in den Promotorregionen führt meist zu einer Verringerung der transkriptionellen Aktivität (Doerfler 1983, Eckhardt, et al. 2006, Razin, et al. 1991). Zum Einen gehen die Änderungen des Methylierungsstatus mit der Veränderung der Chromatinstruktur bzw. der Topologie des Promotors einher (Muiznieks, et al. 1994). Diese Veränderungen ermöglichen unter anderem den Übergang von der rechts- zur linksgängigen DNA-Struktur. Hierdurch wird die Zugänglichkeit bestimmter DNA-Bereiche z.B. des Promotors für regulatorische Proteine verändert. Zum Anderen wird der Zugang aber auch über die DNA-Sequenz selbst bestimmt. Transkriptionsfaktoren wie AP-2, cMyc/Myn, NF- κ B, NRF-1 oder E2F erkennen bestimmte Sequenzen, die 5'-CG-3' Dinukleotide enthalten. Die Methylierung der Cytosinreste in diesen Sequenzen verhindert die Bindung der Transkriptionsfaktoren an den Promotor und verringert damit die Transkription des entsprechenden Gens (Tate, et al. 1993). Die DNA-Methylierung gilt daher als potenter Suppressor der Gen-Aktivität (Jones, et al. 1999).

Eine andere Gruppe von Transkriptionsfaktoren hingegen bindet nur an DNA-Sequenzen, die methylierte Cytosinreste enthalten. Diese Transkriptionsfaktoren besitzen alle eine MBD (*methyl-CpG-binding domain*) Domäne und werden als MBPs (*methylated DNA-binding proteins*) bezeichnet. Zur Gruppe dieser Proteine gehören neben MeCP2 auch MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4 (Cross, et al. 1997, Hendrich, et al. 1998, Lewis, et al. 1992, Meehan, et al. 1989). Auch für den Transkriptionsfaktor Kaiso der zur BTB/POZ Familie der Transkriptionsfaktoren gehört und Teil des N-CoR Komplexes ist, sowie für die verwandten Proteine ZBTB4 und ZBTB38 konnte gezeigt werden, dass sie vorwiegend an methylierte CGCGs oder die Kaiso Konsensusbindestelle (KBS) binden (Filion, et al. 2006, Prokhorchuk, et al. 2001, Yoon, et al. 2003), ihre Methyl-CpG-Bindedomäne (eine Zink-Fingerdomäne) zeigt jedoch keine Homologien zur Methyl-CpG-Bindedomäne der MBPs. Für MeCP2, MBD1, MBD2 (welches mit anderen Proteinen den MeCP1 Komplex bildet) und Kaiso konnte nachgewiesen werden, dass sie Repressoren der Transkription sind (Boyes, et al. 1991, 1992). Diese Proteine interagieren mit Komplexen, die Histondeacetylasen oder andere Chromatin-modifizierende Komplexe enthalten (siehe Abschnitt 2.6) und reprimieren dann z.B. über die Deacetylierung der Lysinreste in den Histonen die Transkription von Genen (Nan, et al. 1998, Ng, et al. 1999). So rekrutiert MeCP2 beispielsweise HDAC1 und HDAC2 durch die Interaktion mit Sin3 (Jones, et al. 1998). Andere Proteine wie

Sp1 sind in der Lage, sowohl an methylierte als auch an nicht methylierte Sequenzen zu binden (Holler, et al. 1988).

2.4 DNA-Methylierung und Erkrankungen

Für zahlreiche Erkrankungen konnte mittlerweile ein Einfluss der DNA-Methylierung in bestimmten Genen nachgewiesen werden. Besonders bei Tumorerkrankungen zeigt sich die Bedeutung der Methylierung. So weisen Onkogene im Tumorgewebe oftmals hypomethylierte Sequenzen auf, d.h. die Gesamtmenge an 5-Methyl-Desoxycytidin ist deutlich verringert (Rauch, et al. 2008). Im Promotorbereich von Tumorsuppressorgenen kann es hingegen zu einer Zunahme der Methylierung kommen (Wang, et al. 2009).

Aber auch für neurodegenerative oder neuronale Erkrankungen wie das Fragile-X-Syndrom (Oberle, et al. 1991, Sutcliffe, et al. 1992) oder das Rett-Syndrom konnten epigenetische Faktoren gefunden werden, die den Krankheitsverlauf beeinflussen oder sogar ursächlich für die Erkrankung sind. So wird beim Fragilen-X-Syndrom das für die Erkrankung ursächliche FMR1 Gen durch Methylierung des bei erkrankten verlängerten CGG-*Repeats* in Promotornähe abgeschaltet. 80% der Patienten mit Rett-Syndrom zeigen Mutationen im *MECP2*-Gen, welches wie oben beschrieben, für ein Protein kodiert, das vorwiegend an methylierte DNA-Bereiche bindet. Es konnte gezeigt werden, dass hierdurch eine Reihe von Zielgenen überexprimiert werden, die durch MeCP2 reprimiert werden. So konnte gezeigt werden, dass MeCP2 unter anderem die Expression folgender Gene reguliert: (1) BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Neurogenese im ZNS (Chang, et al. 2006, Martinowich, et al. 2003); (2) DLX5 (*distal-less homeobox 5*) (Horike, et al. 2005); (3) das FXYP1 Gen welches für eine Natrium-Kalium-Ionenpumpe kodiert und dessen Überexpression zur Störung der Na⁺/K⁺ Homöostase und Funktionalität in Neuronen führt (Deng, et al. 2007); (4) die ID Gene (*inhibitors of differentiation genes*). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Gene des Glukokortikoid Signaltransduktionswegs und eine Komponente des Atmungskomplexes III sowie das Gen für das Kortikotropin freisetzende Hormon (CRH) durch MeCP2 reguliert werden (Kriaucionis, et al. 2006, McGill, et al. 2006, Nuber, et al. 2005, Peddada, et al. 2006). Kürzlich erschienene

Ergebnisse zeigen, dass auch die Expression des Insulin Gens durch Methylierung reguliert werden kann, dies lässt Vermuten, dass die DNA-Methylierung auch bei der Entstehung des Diabetes mellitus eine Rolle spielt (Kuroda, et al. 2009).

2.5 DNA-Methyltransferase Inhibitoren

5-Aza-2' Desoxycytidin (5-Aza; Decitabin) ist ein Inhibitor der DNA-Methyltransferase (DNMT). Dieses Desoxycytidin-Analogon wird in die DNA eingebaut und bindet die DNA-Methyltransferase kovalent an die DNA, sobald die DNMT das integrierte 5-Aza erreicht und methyliert. Daher kommt es in teilungsaktiven Zellen mit jeder Runde des Zellzyklus zu einem progressiven Verlust der DNA-Methylierung (Juttermann, et al. 1994). Eine große Zahl von Genen kann durch die Behandlung von teilungsaktiven Zellen mit dieser Substanz reaktiviert werden (Cairns 2009). Auf diese Weise lassen sich insbesondere anormale Methylierungsmuster entfernen, die in Tumorzellen nachgewiesen werden konnten. Daher werden DNA-Methyltransferase-Inhibitoren wie Decitabin oder das Analogon Zebularin schon seit einiger Zeit in klinischen Studien zur Krebsbehandlung getestet (Brueckner, et al. 2004). Decitabin ist mittlerweile von der FDA (U.S Food & Drug Administration) zur Behandlung von Myelodysplastischen Syndromen (MDS) zugelassen (www.cancer.gov).

2.6 Histon-Acetylierung

Die DNA liegt im eukaryotischen Zellkern nicht frei, sondern in Form von Chromatin vor. Das Chromatin besteht neben der DNA aus basischen Proteinen, den Histonen, sowie aus nicht-Histon-Proteinen (Jenuwein, et al. 2001). Die Histone sind eine Gruppe von fünf ähnlichen Proteinen (H1, H2A, H2B, H3, H4), die sich durch eine zentrale, globuläre Proteindomäne und flexible Arme mit vielen positiv geladenen Aminosäuren (Lysin und Arginin) auszeichnen. Die Nukleosomen stellen die Grundeinheit des Chromatins dar. Nukleosomen bestehen aus zwei Dimeren der Histone H2A und H2B, die sich an ein Tetramer aus den Histonen H3 und H4 anlagern (Luger, et al. 1997, Wolffe, et al. 1996). An das resultierende Histonoktamer lagert sich die etwa 2 nm dicke DNA-Doppelhelix mit ihrem negativ geladenen Phosphatrückgrat an. Die um die

Nukleosomen gewundene DNA hat einen Durchmesser von 10 nm und wird daher auch als 10 nm Faser bezeichnet. Das Chromatin ist jedoch im Zellkern noch weiter kondensiert. Durch Anlagerung des Histons H1 an die Eintrittsstelle der DNA in das Nukleosom wird das Chromatin weiter verdichtet. Es bildet sich die sogenannte 30 nm Faser aus. Sie liegt im Zellkern in Schleifen vor, die wiederum an eine Matrix aus nukleären Proteinen gebunden sind. Dies führt zur weiteren Kondensation des Chromatins, welches dann auch als Heterochromatin bezeichnet wird. Die Transkription ist im so kondensierten Chromatin größtenteils inaktiviert.

Chromatin liegt im Zellkern jedoch nicht nur in dieser inaktiven Form vor, sondern unterliegt dynamischen Veränderungen, welche den Zugang für die Proteine der Transkriptionsmaschinerie ermöglichen. Insbesondere die aminoterminalen Enden der Histone unterliegen einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen. Die positiv geladenen Lysin- und Argininreste unterliegen oft einer Methylierung. Serinreste werden oft phosphoryliert, Lysinreste ubiquitiniert oder sumoyliert. Außerdem kommt es häufig zur Acetylierung von Lysinresten (Wolffe, et al. 1996). Die Acetylierung erfolgt durch Histonacetyltransferasen (HAT), welche Acetyl-Gruppen vom Acetylgruppen-Donor Acetyl-Coenzym A auf die Lysinreste in den Armen der Histone übertragen (Jenuwein, et al. 2001). Die Acetylierung der Lysinreste führt zu einer Neutralisierung der positiven Ladungen der Lysinreste. Dadurch bindet die negativ geladene DNA nicht mehr so stark an die Histone. Dies führt zu einer offeneren Chromatinstruktur, die auch als Euchromatin bezeichnet wird. Diese offener Chromatinstruktur hat im Allgemeinen eine verstärkte Transkription zur Folge, da die Promotorregionen der Gene für Transkriptionsfaktoren leichter zugänglich sind (Bannister, et al. 1996, Brownell, et al. 1996).

Die Acetylierung unterliegt einer genauen Regulation und kann durch Histondeacetylasen (HDACs), die Gegenspieler der Histon-Acetylasen (HATs), wieder entfernt werden, so dass es zu einer stärkeren Kondensation des Chromatins kommt. HDACs und HATs spielen also eine entscheidende Rolle in der dynamischen Regulation der Expression von Genen, unter denen sich solche befinden, die wichtige Funktionen bei der Kontrolle des Zellzyklus, der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung haben (Kouzarides 1999). Da diese Gene oft an der Entstehung von Tumorzellen beteiligt sind, wurde nach Substanzen gesucht, welche die Expression dieser Gene durch Verminderung der HDAC-Aktivität beeinflussen können. Es sind

bislang 4 Klassen von Histondeacetylasen bekannt. Die Klassen I, II und IV umfassen Zink-abhängige Histondeacetylasen, die Klasse III ist evolutionär nicht mit den anderen Klassen verwandt und umfasst NAD abhängige Enzyme, die mit der Sir2 Deacetylase der Hefe verwandt sind (Marks, et al. 2004).

Die humanen Enzyme HDAC 1, 2, 3 und 8 gehören zur Klasse I (Emiliani, et al. 1998, Yang, et al. 1997). Sie sind verwandt mit der RPD3 Deacetylase aus der Hefe, haben Molekulargewichte zwischen 22 und 55 kDa und besitzen homologe katalytische Zentren. Die Klasse II umfasst die zur HDA1 Deacetylase der Hefe verwandten humanen Histondeacetylasen 4, 5, 6, 7, 9 und 10, mit molekularen Massen zwischen 120 und 135 kDa (Grozinger, et al. 1999, Tong, et al. 2002). Die Enzyme dieser Klasse sind evolutionär mit der Klasse I verwandt und verwenden denselben enzymatischen Mechanismus (die von Zink katalysierte Hydrolyse einer Acetyl-Lysine-Aminobindung). HDAC 11 bildet aufgrund seiner besonderen Eigenschaften allein die Klasse IV der HDACs.

2.7 HDAC-Inhibitoren

Die Aktivität der „klassischen“ HDAC Isoenzyme der Klassen I, II und IV, nicht jedoch der Klasse III, kann durch Substanzen, sogenannte HDAC-Inhibitoren, vermindert werden. Es zeigte sich, dass HDAC-Inhibitoren in der Lage sind, die Funktion von HDACs durch Bindung an die katalytischen Zentren dieser Enzyme zu inhibieren und damit die Transkription von schätzungsweise 2-10% aller Gene zu erhöhen (Marks, et al. 2004). Die HDAC-Inhibitoren lassen sich in vier Klassen einteilen: (1). *kurzkettige Fettsäuren* wie Butyrat, Phenylbutyrat und Valproinsäure (VPA) (Gottlicher, et al. 2001, Newmark, et al. 1994, Phiel, et al. 2001), (2) *Hydroxamsäuren* wie Trichostatin A, Suberoylanilide Hydroxamsäure, LBH-589 und Scriptaid (Yoshida, et al. 1990), (3) *zyklische Tetrapeptide* wie Trapoxin A, Apicidin und Romidepsin (FK-228), sowie (4) *Benzamide* (MS-275, M344 und CI-994) (Jung, et al. 1999, Saito, et al. 1999). HDAC-Inhibitoren unterscheiden sich sowohl in ihrer Isoenzymselektivität als auch in ihrer Potenz. Einen Überblick über einige HDAC-Inhibitoren gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: HDAC-Inhibitoren unterscheiden sich in ihrer Potenz und HDAC Isoenzymselektivität. * = nicht bestimmt; # = keine komplette Inhibition bei Wirkstoffkonzentrationen von 10 μM (FK-228, Apicidin, MS-275) oder 100 mM (VPA). Abbildung aus (Hahnen, et al. 2008).

	Klasse I				Klasse IIa				Klasse IIb	
	IC ₅₀				IC ₅₀				IC ₅₀	
Inhibitor	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8	HDAC4	HDAC5	HDAC7	HDAC9	HDAC6	HDAC10
TSA	0.002 μM	0.003 μM	0.004 μM	0.456 μM	0.006 μM	*	0.005 μM	0.006 μM	0.003 μM	*
SAHA	0.068 μM	0.164 μM	0.048 μM	1.524 μM	0.101 μM	*	0.104 μM	0.107 μM	0.090 μM	*
FK-228	0.036 μM	0.047 μM	*	*	0.510 μM	*	*	*	#	*
Apicidin	#	0.120 μM	0.043 μM	0.575 μM	#	*	#	#	#	*
MS-275	0.181 μM	1.155 μM	2.311 μM	#	#	*	#	0.505 μM	#	*
VPA	1.6 mM	3.1 mM	3.1 mM	7.4 mM	*	*	#	#	#	*

Die Aktivierung der Genexpression durch HDAC-Inhibitoren für unterschiedliche Zielgene konnte schon in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Brichta, et al. 2003, Garbes, et al. 2009, Hahnen, et al. 2006, Riessland, et al. 2006). Einige HDAC-Inhibitoren sind in der Lage, in Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* einen Wachstumsarrest sowie die Apoptose oder Differenzierung zu induzieren (Eyupoglu, et al. 2005, Eyupoglu, et al. 2006). Entsprechend befinden sich einige Substanzen, z.B. CI-994, Depsipeptide und MS-275 bereits in der klinischen Phase II zur Krebstherapie und zeigen schon bei gut verträglichen Dosierungen eine Antitumoraktivität (Marks, et al. 2004, Marks, et al. 2000). LBH589 (Panobinostat) und SAHA (Vorinostat) sind inzwischen zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) zugelassen (www.cancer.gov). Außerdem sind in den vergangenen Jahren HDAC-Inhibitoren zunehmend auch für die Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen getestet worden (Hahnen, et al. 2008). So konnte beispielsweise in einem Mausmodell für die Amyotrophe Laterale Sklerose (ALS) gezeigt werden, dass die Behandlung der Tiere mit Phenylbutyrat vor dem Auftreten erster Symptome die Lebensdauer der Tiere deutlich erhöhte, die motorischen Fähigkeiten verbesserte und das Absterben der Motoneuronen verringert (Sugai, et al. 2004). In CK-p25 Mäusen, einem induzierbaren Mausmodell für die Alzheimersche Erkrankung (AD) konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Natriumbutyrat die Lern- und Gedächtnisfähigkeit der Mäuse deutlich verbesserte (Fischer, et al. 2007). Für weitere neurodegenerative/neurologische Erkrankungen wie z.B. Morbus Parkinson, Chorea Huntington oder den Schlaganfall konnten Erfolge in *in vivo* Experimenten in Tiermodellen der Erkrankungen durch die Verwendung von HDAC-Inhibitoren verzeichnet werden. Diese Studien belegen die wichtige Rolle der Epigenetik in der Pathogenese und der Therapie einer Vielzahl unterschiedlicher neurodegenerativer Erkrankungen des Menschen. Auch für die in unserem Labor untersuchte spinale Muskelatrophie (SMA) spielen epigenetische Faktoren eine Rolle und werden HDAC-Inhibitoren für eine Behandlung getestet. Die Erkrankung und die Funktionsweise dieser Wirkstoffe zur potentiellen SMA-Therapie sollen daher nachfolgend genauer erläutert werden.

2.8 Die spinale Muskelatrophie

Die proximale spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung des Menschen und nach der zystischen Fibrose die zweithäufigste Ursache für den Tod im Kindesalter. In Europa tritt die SMA mit einer Häufigkeit von 1:6000 bei neugeborenen Kindern auf. In Deutschland sind daher etwa 80 bis 110 Neuerkrankungen pro Jahr zu beobachten. Die Heterozygotenfrequenz liegt bei etwa 1:35 (Feldkotter, et al. 2002). Bei der SMA handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die durch das Absterben der α -Motoneuronen im Rückenmark gekennzeichnet ist. Als Folge der Degeneration der motorischen Vorderhornzellen im Rückenmark kommt es zunächst zu einer Muskelschwäche, im weiteren Krankheitsverlauf dann zu einer Muskelatrophie. Zunächst ist nur die Muskulatur der rumpfnahen Extremitäten betroffen, später dann auch die Rumpfmuskulatur selbst. Die Beinmuskulatur ist früher und stärker involviert als die Muskulatur der Arme. Die Augen- und Gesichtsmuskulatur ist nie betroffen. Die Schwächung der Atemmuskulatur führt bei den betroffenen Patienten schließlich häufig zu Lungenentzündungen (Pneumonien) an deren Folgen sie versterben. Die klinische Ausprägung der SMA variiert stark bezüglich des Erkrankungsalters, der motorischen Fähigkeiten und der Lebenserwartung der Patienten. Die SMA wurde deshalb in vier Subtypen unterteilt (Munsat, et al. 1992, Zerres, et al. 1995).

SMA Typ I (Werdnig-Hoffmann): Diese schwerste Form der spinalen Muskelatrophie, SMA Typ I, wird auch als akute Form der SMA bezeichnet. Die ersten Symptome der Erkrankung treten bei diesem Typ bereits in den ersten sechs Lebensmonaten auf. In einigen Fällen kann die Erkrankung sogar schon im letzten Drittel der Schwangerschaft beginnen. Kinder, die an dieser Form der SMA erkranken, sind hypotonisch und können niemals ohne Hilfe sitzen oder den Kopf heben. Mehr als 90% der SMA Typ I Patienten versterben bereits vor Vollendung des zweiten Lebensjahres. Nur etwa 8% der Patienten erreichen das 10. Lebensjahr (Munsat, et al. 1992, Zerres, et al. 1995).

SMA Typ II (intermediäre Form): Kinder mit SMA Typ II zeigen erste Anzeichen der Erkrankung bereits zwischen dem sechsten und achtzehnten Lebensmonat. Sie können sitzen, aber niemals ohne Hilfe stehen oder laufen. Die Lebenserwartung dieser Patienten ist deutlich reduziert, sie versterben meist jedoch nicht vor dem 2. Lebensjahr und etwa 70% der Patienten werden älter als 20 Jahre.

SMA Typ III (Kugelberg-Welander): Die ersten Symptome treten bei SMA Typ III Patienten zwischen dem 18. Lebensmonat und dem 30. Lebensjahr auf. Je nach dem Zeitpunkt des Auftretens der ersten Krankheitszeichen wird dieser Typ in zwei weitere Subtypen unterteilt (Zerres, et al. 1995). Patienten, bei denen die ersten Symptome vor Vollendung des dritten Lebensjahres auftreten, werden als Typ IIIa klassifiziert. Tritt die Krankheit nach dem dritten Lebensjahr in Erscheinung, spricht man von der SMA Typ IIIb. SMA Typ III Patienten sind in der Lage, selbstständig zu stehen und zu gehen, jedoch im weiteren Krankheitsverlauf häufig auf einen Rollstuhl angewiesen. Die Lebenserwartung der an einer Typ III SMA erkrankten Patienten ist meist nicht beeinträchtigt (Zerres, et al. 1995).

SMA Typ IV (adulte SMA): Die vergleichsweise seltene adulte SMA Typ IV tritt nach dem 30. Lebensjahr auf. Die Krankheit beginnt meist unauffällig und zeigt einen milden Verlauf. Die motorischen Einschränkungen sind vergleichsweise gering und die Patienten haben eine normale Lebenserwartung.

2.9 Die genetische Ursache der SMA

2.9.1 Die *survival motor neuron* Gene (*SMN1*, *SMN2*)

Das für die SMA Typ II und III verantwortliche Gen konnte 1990 durch Kopplungsanalysen dem Chromosom 5q11.2-q13.3 zugeordnet werden (Brzustowicz, et al. 1990, Melki, et al. 1990). Der Nachweis, dass auch der SMA Typ I mit diesem Locus gekoppelt ist, gelang ein halbes Jahr später (Gilliam, et al. 1990, Melki, et al. 1990). Bis 1995 konnte die Kandidatenregion auf Chromosom 5q11.2-13.3 durch Kopplungsanalysen deutlich eingegrenzt werden. 1995 wurde schließlich das für die SMA Typ I-III ursächliche *survival motor neuron 1* (*SMN1*) Gen durch positionelle Klonierung identifiziert. Das *SMN1*-Gen hat eine genomische Größe von 28 kb, das offene Leseraster von 883 bp erstreckt sich über 9 Exons (1,2a, 2b-8) (Chen, et al. 1998, Lefebvre, et al. 1995). Das *SMN1*-Gen befindet sich mit anderen Genen wie z.B. *SERF1* (*small EDRK-rich factor 1*) und *NAIP* (*NLR family apoptosis inhibitory protein*) in einem etwa 500 kb großen, duplizierten und invertierten Abschnitt. Je nach Orientierung wurden die Wiederholungseinheiten dieses Bereiches als 'telomerisch' oder 'centromerisch' bezeichnet. Entsprechend liegen die Gene dieser

Wiederholungseinheiten in mehreren Kopien pro Chromosom 5 vor. Die telomerische Wiederholungseinheit trägt das für die SMA Typ I-III verantwortliche *SMN1*-Gen, während die centromerische Wiederholungseinheit eine nahezu identische Genkopie, das *SMN2*-Gen, trägt. Die beiden paralogen Gene unterscheiden sich lediglich durch fünf Nukleotide im 3'-Bereich beider Genkopien, und zwar in den Exons 7 und 8 sowie in den Introns 6 und 7 (Abbildung 1).

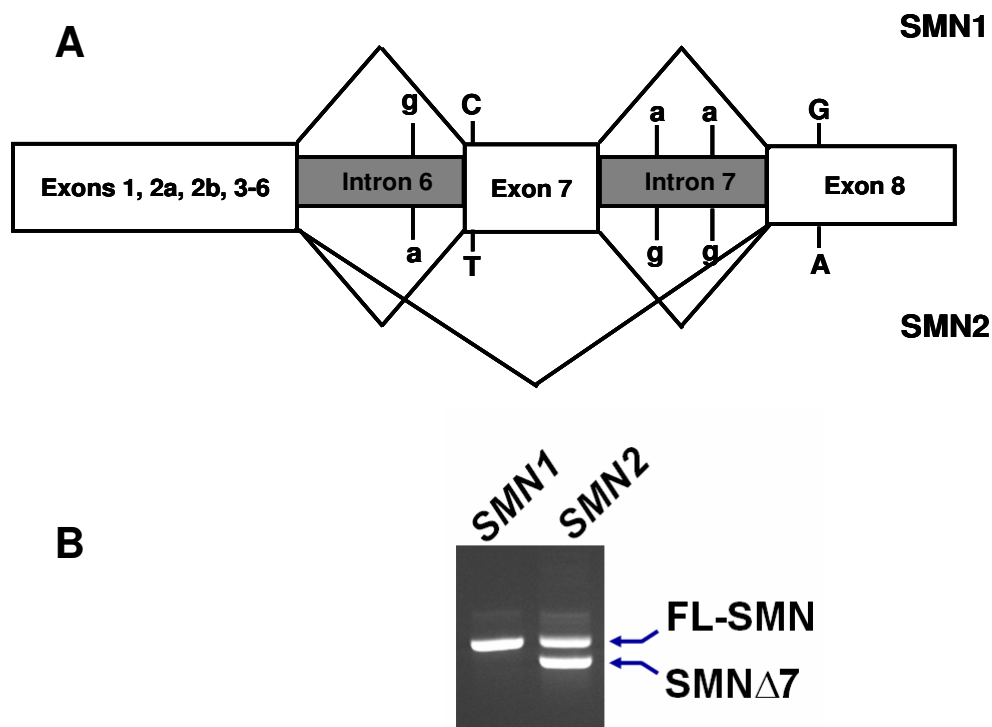


Abbildung 1: (A) Schematische Darstellung der fünf Nukleotidunterschiede zwischen der *SMN1* (oben) und der *SMN2*-Genkopie (unten). Die Basenunterschiede befinden sich im 3'-Bereich der SMN-Gene in den Introns 6 und 7, sowie Exons 7 und 8 (Abbildung modifiziert nach Wirth 2002). (B) Das *SMN1*-Gen produziert vorwiegend Volllängentranskripte, die alle 9 Exons enthalten, während *SMN2*-Primärtranskripte alternativ gespleißt werden (Abbildung von Dr. Hahnen).

2.9.2 Mutationen des *SMN1*-Gens

Die beschriebenen Basenunterschiede zwischen den *SMN1* bzw. *SMN2*-Genen werden zur molekulargenetischen Diagnostik der SMA genutzt (Scheffer, et al. 2001). Insgesamt zeigen etwa 95% aller SMA Patienten (Typ I-III) eine homozygote Abwesenheit der Exons 7 und 8 oder nur des Exons 7 der *SMN1*-Genkopie (Wirth 2000). Dabei zeigen 96% der Typ I Patienten, 94% der Typ II Patienten und 84% der Typ III Patienten aus unserem Patientenkollektiv diesen Genotyp (Hahnen, et al. 1997). Eine homozygote Abwesenheit des *SMN2*-Gens allein hat keine SMA oder sonstige phänotypische Ausprägung zur Folge und kann bei etwa 5% aller gesunden Personen gefunden werden. Ein homozygoter Verlust beider Genkopien (*SMN1*, *SMN2*) wurde beim Menschen niemals identifiziert und ist vermutlich embryonal letal, da dieser Effekt für den *knock-out* des *Smn*-Gens der Maus gezeigt werden konnte (Schrack, et al. 1997).

Etwa 3% der SMA I-III Patienten sind '*compound heterozygot*', d.h. sie tragen einen Verlust des *SMN1*-Gens auf dem einen Chromosom 5 und eine intragenische *SMN1* Mutation auf dem anderen Chromosom 5 (Wirth, et al. 1999). Es wurden bereits zahlreiche verschiedene intragenische *SMN1*-Mutationen beschrieben, welche die Funktion des SMN-Proteins beeinträchtigen (Ogino, et al. 2004, Sun, et al. 2005). Im Falle der seltenen SMA Typ IV wurden nur in wenigen Fällen Veränderungen des *SMN1*-Gens identifiziert (Brahe, et al. 1995, Wirth, et al. 2006).

Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten, die zu einem Verlust des *SMN1*-Gens führen können. Zum Einen kann das *SMN1*-Gen komplett oder in Teilen deletiert sein, zum Anderen kommt es aufgrund der hohen Sequenzhomologie der SMN-Gene häufig zur Genkonversion von *SMN1* zu *SMN2*, oder von *SMN2* zu *SMN1*. Das bedeutet, dass eine *SMN1*- in eine *SMN2*-Genkopie (bzw. *SMN2* in *SMN1*) umgewandelt wird. Danach sind statt einer *SMN1*- und einer *SMN2*-Kopie zwei *SMN2*- oder *SMN1*-Genkopien vorhanden. Die Genkonversion wurde als Hauptursache für die hohe Variabilität der *SMN2*-Kopienzahl identifiziert (Hahnen, et al. 1997, van der Steege, et al. 1996). Die SMA-Region auf Chromosom 5q11.2-q13.3 ist aufgrund ihres polymorphen Charakters relativ instabil, d.h. es konnten bei SMA-Patienten auch *de novo* Deletionsereignisse identifiziert werden (Wirth, et al. 1997).

2.9.3 Expression und Prozessierung der *SMN*-Primärtranskripte

Die beiden *SMN*-Gene weisen ein identisches Expressionsmuster auf und werden ubiquitär exprimiert. Während das *SMN1*-Gen jedoch hauptsächlich Volllängetranskripte (FL-*SMN*) produziert, welche alle Exons enthalten (Exon1, 2a, 2b, 3-8), produziert das *SMN2* hingegen hauptsächlich Transkripte, denen das Exon 7 fehlt ($\Delta 7$ -*SMN*). Ursächlich für die unterschiedliche Prozessierung der *SMN1* und *SMN2* Primärtranskripte ist ein Nukleotidaustausch in Exon 7 der *SMN*-Gene (C zu T Transition, siehe Abbildung 2) (Lorson, et al. 1999).

Durch welche Spleißfaktoren die unterschiedlichen Spleißmuster der *SMN*-Gene vermittelt werden, ist noch nicht schlüssig geklärt. Nach einer älteren Hypothese zerstört der C zu T Nukleotidaustausch an Position +6 des Exon 7 einen exonischen Spleißverstärker (*exonic splicing enhancer*), was zu einem Ausschluss des Exons 7 beim Spleißen der *SMN2*-Primärtranskripte führt (Lorson, et al. 1999). Nach diesem Modell ist der Basenunterschied in Exon 7 Bestandteil eines heptameren Erkennungsmotivs, welches im Falle der *SMN1* prä-mRNA durch den Spleißfaktor SF2/ASF erkannt wird (Cartegni, et al. 2002). Nach einer gegensätzlichen Hypothese (Kashima, et al. 2003) entsteht durch die C zu T Transition ein *exonic splice silencer* in Exon 7 des *SMN2*-Gens, der durch den Spleißfaktor hnRNP A1 erkannt wird. Dies führt wiederum zum Ausschluss von Exon 7. Keine der beiden Hypothesen ist bisher schlüssig widerlegt und sie schließen sich auch nicht zwangsläufig aus (Cartegni, et al. 2006, Kashima, et al. 2007, Kashima, et al. 2007). Neben SF2/ASF und hnRNP A1 sind weitere Spleißfaktoren sowie SR und SR-artige Proteine beteiligt. SR-Proteine sind Serin/Arginin-reiche Proteine bzw. Spleißfaktoren. *In vitro* Experimente zeigten, dass die Überexpression des SR-artigen Spleißfaktors SFRS10 (Htra2- $\beta 1$) im Falle der *SMN2*-Primärtranskripte zum verstärkten Einschluss von Exon 7 führt. Auf diese Weise werden bis zu 80% Volllängetranskripte gebildet (Hofmann, et al. 2000). Das *SMN2*-Spleißmuster kann also durch die Aktivität verschiedener Spleißfaktoren moduliert werden. Die Modulation des Spleißens von *SMN2* durch die Spleißfaktoren SF2/ASF und SFRS10 nach der Hypothese von Hofmann & Wirth 2002 sowie Cartegni & Krainer 2002 ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Spleißfaktoren SFRS10 und SF2/ASF interagieren direkt mit der *SMN2*-prä-mRNA (Cartegni, et al. 2002, Hofmann, et al. 2000), während andere Spleißfaktoren wie SRp30 oder hnRNP-G indirekt über die Interaktion mit SFRS10 wirken (Hofmann, et al. 2000, Young, et al. 2002).

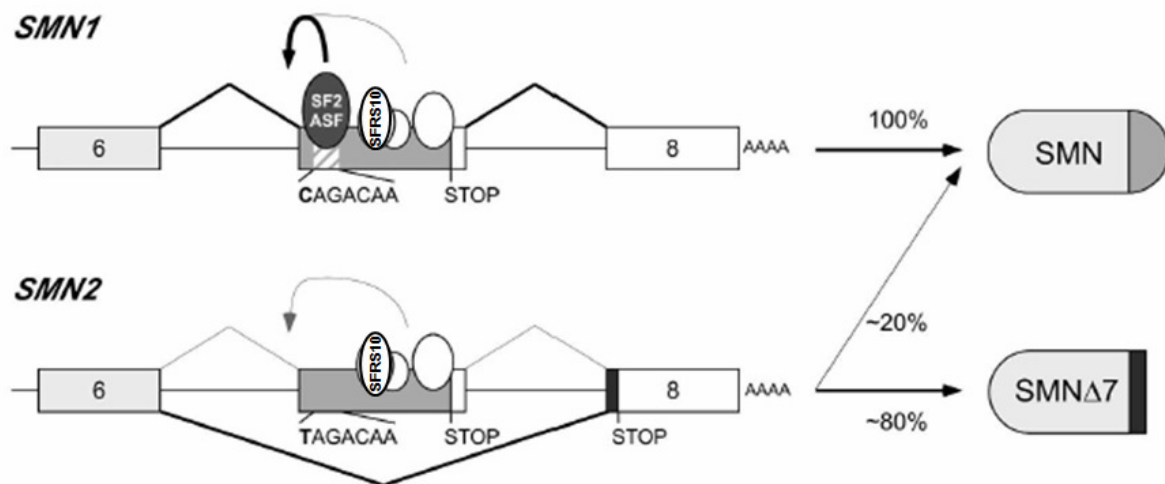


Abbildung 2: Schematische Darstellung des *SMN1* und *SMN2* Spleißens. Dargestellt ist das 3'-Ende des *SMN1* bzw. des *SMN2*-Gens. Das *SMN1*-Gen produziert ausschließlich FL-SMN Transkripte, während der Mehrzahl der *SMN2*-Transkripte das Exon 7 fehlt. Nach Cartegni & Krainer (2003) zerstört der Nukleotidunterschied in Exon 7 einen exonischen splicing enhancer, der im Falle des *SMN1* durch den Spleißfaktor SF2/ASF erkannt wird. Der Spleißfaktor SFRS10 begünstigt den Einschluss des Exons 7 (Abbildung verändert nach Cartegni et al. 2002).

2.9.4 Das SMN-Protein

Beide *SMN*-Gene werden ubiquitär exprimiert, wobei die Expression im Rückenmark vergleichsweise hoch ist (Coover, et al. 1997, Lefebvre, et al. 1997). Das FL-SMN-Protein hat ein Molekulargewicht von 38 kDa. Das *SMN2*-Gen produziert hauptsächlich ein verkürztes Protein, dem die von Exon 7 codierte Peptidsequenz fehlt. Dieses verkürzte Protein ist daher weniger stabil (Lorson, et al. 1998), besitzt aber offenbar noch eine Restfunktion. Dies konnte in SMA-Mäusen gezeigt werden, die zusätzlich ein Transgen tragen, von dem nur Transkripte gebildet werden, denen das Exon 7 fehlt (*SMNΔ7*). SMA-Mäuse, die das *SMNΔ7*-Transgen tragen, überleben länger als SMA-Mäuse ohne dieses Transgen (Le, et al. 2005). In der Zelle ist das SMN-Protein im Zytoplasma und im Zellkern nachweisbar. Während das SMN-Protein im Zytoplasma diffus verteilt vorliegt, ist es im Zellkern Bestandteil von sogenannten *gemini of coiled bodies* (*Gems*, siehe Abbildung 3). *Gems* sind im Zellkern durch Immunfluoreszenzfärbung nachweisbar und treten als punktförmige Strukturen auf. Sie befinden sich in der Nähe der *coiled bodies* oder überlagern sich mit diesen (Carvalho, et al. 1999, Liu, et al. 1996).

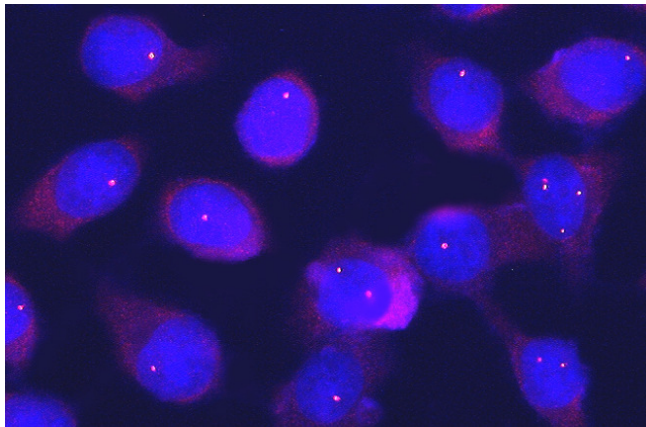


Abbildung 3 Immunfluoreszenzfärbung des SMN-Proteins in Hela Zellen. Das SMN-Protein (rot) liegt diffus verteilt im Zytoplasma vor sowie in stark lichtbrechenden Strukturen im Zellkern (sog. 'Gems'). Die Zellkerne sind blau markiert (DAPI Färbung). Die Anzahl der Gems in Hela Zellen variiert zwischen 1 und 5 (Abbildung aus der Doktorarbeit von Dr. Hahnen).

In primären Fibroblasten von SMA-Patienten, die einen homozygoten Verlust des *SMN1*-Gens zeigen, korreliert sowohl die Menge an SMN-Protein als auch die Anzahl der Gems mit dem Schweregrad der Erkrankung. Fibroblastenzellen von Patienten mit einer SMA Typ I zeigen in Western-Blot Analysen eine deutlich verringerte SMN-Proteinmenge. Gems sind hier in der Regel nicht nachzuweisen. Bei Patienten mit Typ III SMA hingegen ist die SMN-Proteinmenge in den Fibroblasten nur leicht reduziert und Gems sind nachweisbar (Coover, et al. 1997).

Das SMN-Protein ist in der Lage, mit sich selbst zu oligomerisieren. Diese Oligomerisierung scheint für die Funktion des SMN-Proteins essentiell zu sein. Dies zeigt die Tatsache, dass bei SMN-Proteinen, denen das Exon 7 fehlt, die Fähigkeit zur Selbstoligomerisierung deutlich reduziert ist (Lorson, et al. 1998). Dies könnte eine Erklärung dafür liefern, weshalb das *SMN2*-Gen den Verlust des *SMN1* nicht vollständig kompensieren kann. Zudem wurden in SMA-Patienten Mutationen in der Domäne gefunden, die für die SMN-SMN Oligomerisierung verantwortlich ist (Exon 6 und Exon 7). Diese Mutationen beeinträchtigen die Fähigkeit zur Selbstoligomerisierung deutlich (Lorson, et al. 1998). Das SMN-Protein interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen direkt oder indirekt. Die genaue Funktion des SMN-Proteins ist noch nicht abschließend geklärt. Das SMN-Protein hat eine wichtige Funktion bei der Assemblierung von snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) und Spleißosomen. Dies konnte anhand der Interaktion von SMN mit Gemin2/SIP1 (Fischer, et al. 1997, Liu, et al. 1997) sowie Gemin 3-7 (Baccon, et al. 2002, Charroux, et al. 1999, Charroux, et al. 2000, Gubit, et al. 2002, Pellizzoni, et al. 2002) nachgewiesen werden. Darüber hinaus interagiert SMN mit den Sm (Smith antigen) und LSm (Sm ähnliche) Proteinen sowie mit dem

Zinkfingerprotein ZPR1 (Gangwani, et al. 2001). Die Interaktion von SMN mit Fibrillarin und GAR1 (Jones, et al. 2001, Liu, et al. 1996, Pellizzoni, et al. 2001) zeigt eine wichtige Funktion bei der Assemblierung von snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoprotein particles*). Die Assemblierung der coiled bodies wird von SMN beeinflusst, wie durch die Interaktion mit coilin gezeigt werden kann (Young, et al. 2001).

Diese universellen Funktionen des SMN-Proteins erklären aber nicht, warum es zum selektiven Verlust der α -Motoneuronen kommt, da beispielsweise eine Funktionsstörung der Spleißosomen alle Zellen betreffen würde. Vermutlich sind weitere Funktionen des SMN-Proteins für das Überleben der α -Motoneurone essentiell. Es konnte bereits gezeigt werden, dass SMN am Transport und an der Prozessierung von β -Aktin RNA in Axonen von Motoneuronen durch Interaktion mit hnRNP-R und hnRNP-Q beteiligt ist (Rossoll, et al. 2003, Rossoll, et al. 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass der Transport des SMN-Proteins in das Zytoplasma gestört ist, wenn die durch Exon 7 codierte Region fehlt. Für einen Transport, der auf dem Zytoskelett beruht, ist also ein vollständiges SMN-Protein notwendig.

In mit SMN-Konstrukten transfizierten Neuronen der Ratte bewirkt das Fehlen von Exon 7 einen stark verringerten Neuriten-Auswuchs (Zhang, et al. 2003). Dies könnte die Muskelschwäche in SMA-Patienten und die daraus resultierende Atrophie als Folge der unzureichenden Innervierung der Muskulatur erklären. In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass das SMN-Protein essentiell ist. Knock-out Mäuse, denen das murine *Smn* Gen fehlt, sind embryonal letal (Schrack, et al. 1997). Transgene Tiere, die neben dem *Smn* Knock-out zwei oder mehr Kopien des humanen *SMN2*-Gens tragen, überleben hingegen und dienen als Mausmodell für die SMA (Hsieh-Li, et al. 2000, Le, et al. 2005, Monani, et al. 2000).

2.10 Der Promotor der *SMN*-Genkopien

Wie beschrieben, befinden sich das *SMN1*-Gen und die *SMN2*-Genkopie innerhalb eines etwa 500 kb großen, duplizierten und innervierten Bereichs auf Chromosom 5 (Lefebvre, et al. 1995). Beide Gene sind nahezu identisch, dies gilt insbesondere auch für die Promotorsequenzen (Boda, et al. 2004, Echaniz-Laguna, et al. 1999, Monani, et

al. 1999). Die *SMN*-Genkopien können sich aber in der Anzahl der CA-Wiederholungen des polymorphen Markers Ag1CA/C272 in der Region um 469 bp stromaufwärts vom ATG unterscheiden. Die Anzahl dieser Wiederholungen variiert in beiden *SMN*-Genen stark (DiDonato, et al. 1994, Wirth, et al. 1995). Die An- oder Abwesenheit scheint keinen Einfluss auf die Expression der *SMN*-Genkopien zu haben (Echaniz-Laguna, et al. 1999). Insgesamt wurden für die *SMN*-Genkopien 3 unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte identifiziert. Die erste Transkriptionsstartstelle (TSS) befindet sich 296 bp stromaufwärts vom ATG an Position +1 (Monani, et al. 1999). Die zweite TSS befindet sich 241 bp stromaufwärts vom ATG und wird offenbar hauptsächlich während der Embryonalentwicklung verwendet (Germain-Desprez, et al. 2001). Die dritte TSS liegt nur 162 bp vor dem ATG und scheint die hauptsächlich verwendete TSS zu sein (Echaniz-Laguna, et al. 1999). Außerdem konnte eine putative TATA Box für die Region -49 Basen stromaufwärts von diesem 3. Transkriptionsstartpunkt identifiziert werden. Es wurden mehrere Versuche unternommen, den Minimalpromotor der *SMN*-Genkopien näher zu bestimmen. Auch wenn die Ergebnisse der Untersuchungen voneinander abweichen, konnte der Minimalpromotor doch näher eingegrenzt werden, er entspricht etwa einem Bereich von 150 bp stromaufwärts und stromabwärts vom 3.TSS an Position -162. In allen Untersuchungen der *SMN*-Promotorregion konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass die Vergrößerung der Promotorregion in Promotorkonstrukten um einige hundert Basenpaare im 5'Bereich zu einer deutlichen Steigerung der Promotoraktivität führt. Dies deutet auf das Vorhandensein von aktivierenden regulatorischen Regionen in diesem Bereich hin. Eine noch weitere Vergrößerung der Promotorregion hingegen hat in unterschiedlichen Zelllinien unterschiedliche Auswirkungen. Während in neuronalen Zellen der vollständige Promotorbereich (~4,8kb) die höchste Aktivität aufwies, zeigte dieses Konstrukt in Fibroblasten eine geringere Aktivität als ein kürzeres etwa 2,6 kb großes Promotorkonstrukt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die weiter von den Transkriptionsstartpunkten entfernt liegenden Promotorbereiche für die Zell/Gewebetypspezifische Expression der *SMN*-Genkopien von Bedeutung sind (Germain-Desprez, et al. 2001, Rouget, et al. 2005).

Außerdem konnte für den *SMN*-Promotorbereich eine Vielzahl von regulatorischen Elementen in Form von Transkriptionsfaktor-Bindestellen unter anderem für die Proteine E2F-1, GATA2, YY1, HNF-3 und N-Oct3 (Boda, et al. 2004) sowie für Proteine der Sp, Ets und CREB Transkriptionsfaktor-Familien durch bioinformatische Analysen

identifiziert und teilweise durch EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) Analysen nachgewiesen werden (Sp1 und CREB-1), (Echaniz-Laguna, et al. 1999, Germain-Desprez, et al. 2001, Majumder, et al. 2004, Rouget, et al. 2005).

```

2401 CCCCATGTTTGTCTTTCTTTGTTTGTCTTTATATAGATCAAGCAGGTTTTAAATTCCTAG 2460
2461 TAGGAGCTTACATTTACTTTTCCAAGGGGGAGGGGGAATAAATATCTACACACACACACA 2520
2521 CACACACACACACACACACACACACACTGGAGTTCGAGACGAGGCCTAAGCAACATGCCG 2580
2581 AAACCCCGTCTCTACTAAATACAAAAAATAGCTGAGCGTGGTGGCGCACGCCTATAGTCC 2640
2641 TAGCTACTGGGGAGGCTGAGGTGGGAGGATCGCTTGAGCCCAAGAAGTCGAGGCTGCAGT 2700
2701 GAGCCGAGATCGCGCCGCTGCACTCCAGCCTGAGCGACAGGGCGAGGCTCTGTCTCAAAA 2760
      ↑ 1.TSS                                2.TSS(fetale Entwicklung) ↑
2761 CAAACAAACAAAAAAGGAAAGGAAAATAAACAAGTGAATGAAAGGATTGAGAGA 2820
2821 AATGAAAAATATACACGCACAAATGTGGGAGGGCGATAACCACTCGTAGAAAGCGTGAG 2880
      ↑ 3.TSS
2881 AAGTTACTACAAGCGGTCTCCCGGCCACCGTACTGTTCCGCTCCCAGAAGCCCCGGGCG 2940
2941 GCGGAAGTCGTCACTCTTAAGAAGGGACGGGGCCCCACGCTGCGCACCCGCGGGTTTGCT 3000
3001 ATGCGCATGAGCAGCGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCCCGGAGCAGGAGGATTCCGTGCTG 3060
3061 TTCCGGCGCGGCACAGGCCAGGTGAGGTGCGCAGCCAGTGCAGTCTCCCTATTAGCGCTCT 3120

```

Abbildung 4: Schematische Übersicht über den Promotorbereich der *SMN*-Genkopien. Die Transkriptionsstartstellen (TSS) sind gelb, der Translationsstartpunkt und das erste Exon sind hellrot hervorgehoben. Außerdem ist die TATA Box rot markiert.

2.11 SMA modifizierende Gene/Proteine

Veränderungen des *SMN1*-Gens alleine können aber nicht den extrem variablen Phänotyp der SMA erklären. Zahlreiche Studien zeigen, dass der Schweregrad der Krankheit in der Regel mit der Anzahl der *SMN2*-Genkopien korreliert. 80% der SMA Typ I Patienten tragen eine oder zwei *SMN2*-Kopien, 82% der SMA Typ II Patienten drei *SMN2*-Genkopien, während 96% der SMA Typ III Patienten drei oder vier *SMN2*-Genkopien tragen (Feldkotter, et al. 2002). Die Bestimmung der *SMN2*-Kopienzahl könnte zur Prognose des Krankheitsverlaufs genutzt werden. Patienten mit einer oder zwei *SMN2*-Kopien erkranken mit einer Wahrscheinlichkeit von über 97% an einer SMA Typ I, während Patienten mit drei *SMN2*-Kopien mit einer Wahrscheinlichkeit von 83% an einer SMA Typ II erkranken (Feldkotter, et al. 2002).

In seltenen Fällen können in sogenannten diskordanten Familien haploidentische Geschwister mit gleicher *SMN2*-Kopienzahl und gleicher *SMN1* Mutation unterschiedliche Phänotypen von gesund bis SMA Typ I aufweisen (Cobben, et al. 1995, Hahnen, et al. 1995, Wang, et al. 1996). Für einige dieser Familien konnte durch unser Institut das *Plastin-3* Gen als das den Krankheitsverlauf modifizierende Gen identifiziert werden (Oprea, et al. 2008), während dieses Phänomen in den anderen Familien noch nicht erklärt werden konnte. Die verstärkte Expression dieses Genprodukts scheint in weiblichen Personen, die auf Grund ihres Genotyps an einer SMA erkranken müssten, protektiv zu wirken. Vermutlich führt die stärkere Plastin-3 Expression zu einer Stabilisierung des Zytoskeletts, insbesondere auch der Axone in den α -Motoneuronen. Dies hat zur Folge, dass mehr funktionelle Verbindungen der Motoneuronen zu den Muskelzellen erhalten bleiben und weniger α -Motoneuronen zu Grunde gehen. Diese protektive Wirkung des Plastin-3 Proteins konnte bereits im Tiermodell (Zebrafisch) sowie in Motoneuronen aus SMA Mäusen und in PC12 Zellen der Ratte nachgewiesen werden.

Aktuelle Untersuchungen an Patienten deren milderer Form der SMA nicht mit der Anzahl der *SMN2*-Kopien korreliert zeigen, dass eine Mutation im Exon 7 des *SMN2* Gens zu einem milderer Krankheitsverlauf führt, da durch diese Mutation ein exonischer Spleißverstärker entsteht, der die Menge an *SMN*-Volllängentranskript erhöht (Prior, et al. 2009). Der Schweregrad der SMA wird also nicht nur durch die Anzahl der

SMN2-Genkopien bestimmt, sondern kann auch von der Sequenz dieser Genkopien modifiziert werden.

2.12 *SMN2* als Zielgen der SMA-Therapie

SMN2 stellt ein hochinteressantes Zielgen zur SMA-Therapie dar. Durch die Expressionssteigerung der bei SMA-Patienten vorhandenen *SMN2*-Genkopien könnte eine Erhöhung der FL-SMN-Proteinmenge im betroffenen Gewebe und damit eine Milderung des Krankheitsverlaufs erreicht werden. Der gleiche Effekt kann durch eine Änderung des *SMN2*-Spleißmusters erzielt werden. Eine Expressionssteigerung z. B. des Spleißfaktors SFRS10 im Zielgewebe führt zu einer bevorzugten Prozessierung der *SMN2*-Transkripte zu FL-SMN mRNA und würde somit dem Krankheitsverlauf entgegenwirken (Hofmann, et al. 2000).

2.13 Histondeacetylase-Inhibitoren zur Therapie der SMA

Eine besonders interessante Gruppe von Wirkstoffen stellen Inhibitoren der Histondeacetylasen (HDAC) dar. Bei den Fettsäuren Natriumbutyrat, Phenylbutyrat sowie Valproinsäure (Gottlicher, et al. 2001, Phiel, et al. 2001) handelt es sich um vergleichsweise schwache HDAC-Inhibitoren, die bereits zur Therapie verschiedener Erkrankungen zugelassen sind. In transformierten Lymphozyten und Fibroblasten von SMA-Patienten konnte gezeigt werden, dass Natriumbutyrat (Chang, et al. 2001), Valproinsäure (VPA) (Brichta, et al. 2003) und Phenylbutyrat (Andreassi, et al. 2004) konzentrationsabhängig das Spleißverhalten des *SMN2*-Gens dahingehend ändern, dass mehr FL-SMN-Protein produziert wird. Die Valproinsäure (VPA) wird bereits seit mehr als 30 Jahren zur Epilepsie-Behandlung eingesetzt und erhöht in Fibroblastenzelllinien von SMA-Patienten die FL-SMN-Proteinmenge sowohl durch die Aktivierung der Transkription, als auch durch die Änderung des Spleißmusters (Brichta, et al. 2003, Sumner, et al. 2003).

In den letzten Jahren wurden weitere, hoch potente HDAC-Inhibitoren wie z.B. Suberoylanilide Hydroxamsäure (SAHA), Rhomidepsin (FK-228), CI-994, M344,

LBH589 und MS-275 entwickelt, die teilweise in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit zur Krebstherapie überprüft werden. Es konnte für SAHA und M344 gezeigt werden, dass beide Substanzen in submikromolaren Dosen unselektiv Zink-abhängige HDAC Isoenzyme inhibieren (Hahnen, et al. 2006). Außerdem erhöhen sie in niedrigen mikromolaren Konzentrationen ($<10 \mu\text{M}$) nicht nur die SMN-Proteinmenge in Fibroblastenzelllinien von SMA-Patienten, sondern ebenfalls in organotypischen Hirnschnittkulturen sowie in Motoneuronen der Ratte (Hahnen, et al. 2006). Insbesondere VPA und SAHA sind gut verträglich und haben wenige Nebenwirkungen. Beide Wirkstoffe zeigen eine gute Bioverfügbarkeit nach oraler Verabreichung und passieren die Blut-Hirnschranke (Hockly, et al. 2003). Die Tatsache, dass VPA auch *in vivo* in SMA-Patienten und Anlageträgern zu einer *SMN2*-Expressionsteigerung führt, lässt hoffen, dass diese Substanzen zur Behandlung der SMA eingesetzt werden kann (Brichta, et al. 2006). Daher befindet sich VPA, das bereits zur Langzeittherapie von Epilepsie-Patienten eingesetzt wird, in klinischer Testung zur SMA-Therapie. Die Ergebnisse der ersten klinischen Studie zeigten, dass VPA von den meisten Patienten gut vertragen wird. Eine signifikante Verbesserung der motorischen Fähigkeiten und ein Anstieg der FL-SMN Transkriptmenge konnte jedoch nicht gezeigt werden (Swoboda, et al. 2009). SAHA wird derzeit von unserer Arbeitsgruppe in Tierversuchen am SMA Mausmodell getestet. Ein weiterer HDAC-Inhibitor aus der Gruppe der Hydroxamsäuren (LBH-589), der für unterschiedliche Erkrankungen in klinischen Studien getestet wird und bereits für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen ist, zeigte in *in vitro* Experimenten in unserem Labor eine starke Steigerung der SMN-Proteinmenge (Garbes, et al. 2009). Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Substanz über mehrere Mechanismen wirkt. Zum einen führte die Behandlung mit LBH589 zur Steigerung der *SMN2*-Expression, zum anderen konnte eine Änderung des Spleißmusters durch die Aktivierung des Spleißfaktors SFRS10 nachgewiesen werden, wodurch die FL-SMN Proteinmenge deutlich gesteigert werden konnte. Als weiterer Mechanismus konnte eine Stabilisierung des SMN-Proteins bestätigt werden. SMN wird über den Ubiquitin-Proteasom Weg abgebaut, die Behandlung mit LBH589 reduzierte die Ubiquitinilierung deutlich und führt so zu einer Stabilisierung des SMN-Proteins.

2.14 Alternative Therapieansätze zur Behandlung der SMA

Baron-Delage *et al.* (2000) testeten die Wirkung von *Interferon β* und *Interferon γ* in Fibroblasten von SMA-Patienten. Sowohl *Interferon β* als auch *Interferon γ* führten zu einer Erhöhung der *SMN2*-Transkriptionsrate, sind jedoch aufgrund gravierender Nebenwirkungen wie Leberzellschädigungen, Nierenfunktions- und neurologischen Störungen zur Langzeittherapie ungeeignet. Andreassi *et al.* (2001) zeigten eine Änderung des *SMN2*-Spleißverhaltens durch *Aclarubicin*, ebenfalls in Fibroblasten von SMA-Patienten. Dieser Wirkstoff ist ein Medikament zur Krebstherapie, ruft jedoch erhebliche Nebenwirkungen hervor und wird deshalb zur SMA-Therapie nicht eingesetzt (Andreassi, et al. 2001).

Hydroxycarbamid (Hydroxyurea) ist ein weiterer Wirkstoff, der in *in vitro* Versuchen die Expression des *SMN2*-Gens steigern konnte. Es konnten in den klinischen Untersuchungen an SMA Patienten jedoch keine positiven Effekte nachgewiesen werden (Liang, et al. 2008).

Auch für Quinazolin konnte gezeigt werden, dass dieser Wirkstoff (ein Hemmer des DcpS Enzyms, welches ein Modulator des mRNA Metabolismus ist und für die Hydrolyse der m(7)GpppN mRNA Cap Struktur verantwortlich ist) in der Lage ist, die *SMN2*-Expression zu steigern und in verschiedenen SMA-Mausmodellen die Lebenserwartung deutlich zu erhöhen (Singh, et al. 2008). Dem Wirkstoff Quinazolin495 wurde von der FDA jetzt der Status als Arzneimittel für seltene Krankheiten garantiert, der die weitere Erforschung dieser Substanz erleichtert und beschleunigen soll (www.fsma.org).

Auch Versuche mit dem Asthmamedikament Salbutamol zeigten in Zellkulturversuchen eine Aktivierung des *SMN2*-Gens. In SMA-Patienten scheint die Behandlung den Phänotyp leicht abzumildern (Angelozzi, et al. 2008, Pane, et al. 2008). Eine weitere Gruppe von Molekülen, die für die SMA-Therapie untersucht werden, sind sogenannte bifunktionelle RNAs. Diese RNAs weisen neben einer Zielsequenz für die SMN prä-mRNA eine Bindestelle für Spleißfaktoren wie z.B. SF2/ASF und SFRS10 auf. Auf diese Weise werden, die Spleißfaktoren rekrutiert und das Spleißen der *SMN2* prä-mRNA wird so beeinflusst, dass es vermehrt zum Einschluss von Exon 7 in die mRNA und damit zu einem Anstieg des Volllängeprodukts kommt (Baughan, et al. 2006, Baughan, et al. 2009, Dickson, et al. 2008, Marquis, et al. 2007, Meyer, et al. 2009).

Ein weiterer Ansatz zur Therapie der SMA ist das Einschleusen einer funktionellen *SMN1*-Kopie in die α -Motoneuronen mittels viraler Vektoren. Dieses Verfahren scheint im Tiermodell bereits zu funktionieren, wird aber auf Grund der großen Risiken bislang nicht bei Patienten angewandt. Außerdem wurden in den letzten Jahren Techniken entwickelt, um aus differenzierten Zellen Stammzellen (sogenannte iPS Zellen) zu gewinnen. Diese Zellen könnten dann wiederum zu α -Motoneuronen differenziert werden und eventuell die zerstörten Motoneuronen ersetzen (Ebert, et al. 2009). Auch dieser Therapieansatz weist große Risiken auf, so besteht beispielsweise die Gefahr, dass die Stammzellen nicht vollständig differenziert sind und in der Lage sind, Teratome zu bilden. Klinische Studien zu diesem Therapieansatz werden vermutlich in den nächsten Jahren stattfinden (Nayak, et al. 2006).

Auch die Aminoglykoside werden als potentielle Wirkstoffe zur Behandlung der SMA untersucht. Diese als Antibiotika bekannten Substanzen stören die Erkennung des Stop-Codons in den *SMN Δ 7* mRNAs und verlängert so das *SMN Δ 7* Protein (Heier, et al. 2009, Mattis, et al. 2009, Mattis, et al. 2006). Diese Verlängerung des *SMN Δ 7* Proteins reicht offenbar um die Funktionalität des Proteins zu erhöhen. In Versuchen mit einem intermediären SMA Mausmodell (*Smn* $-/-$; *SMN2* $+/+$; *SMN Δ 7*) konnte deren Lebenserwartung durch die Behandlung mit Aminoglykosiden verlängert werden (Mattis, et al. 2009).

Grondard et al. konnten zeigen, dass ein regelmäßiges Lauftraining das Leben von Mäusen eines SMA Typ II Mausmodells verlängert (Grondard, et al. 2005). Die Mäuse wurden hierzu ab einem Alter von 10 Tagen in ein Laufrad mit kontrollierbarer Geschwindigkeit gesetzt, wobei die tägliche Trainingsdauer sowie die Geschwindigkeit des Laufrads kontinuierlich gesteigert wurden. Die weiteren Analysen der Arbeitsgruppe ergaben, dass durch dieses regelmäßige Lauftraining die postnatale Reifung der Motorendplatten, welche die Verbindung zwischen den Axonen und den Muskelzellen die sie innervieren darstellen, verbessert wird. Dies verringert den Zelltod der Motoneurone. Außerdem scheint durch das Training die Expression der aktivierenden Hauptuntereinheit der NMDA-Rezeptoren, die NR2A Untereinheit gesteigert zu werden, welche in den SMA-Mäusen deutlich reduziert ist. Die Expressionsteigerung der NMDA-Rezeptoren scheint daher eine weitere Therapieoption für die SMA zu sein.

Da nahezu alle SMA-Patienten mindestens eine *SMN2*-Genkopie tragen, stellte die Steigerung der Volllänge-SMN-Proteinmenge von diesem Gen aus sicherlich die

bislang aussichtsreichste Therapieoption für die SMA dar. Wie beschrieben sind mehrere Wirkstoffgruppen und Substanzen (z.B. HDAC-Inhibitoren und Quinazolin) in der Lage, die Expression des *SMN2*-Gens in *in vitro* Experimenten zu aktivieren, das Spleißmuster des Exon 7 positiv zu modulieren (HDAC-Inhibitoren, bifunktionelle RNAs) oder durch überlesen des Stopp-Codons das SMN-Protein zu stabilisieren (Aminoglykoside) und so die SMN-Proteinmenge zu erhöhen. Die Behandlung von SMA-Patienten mit den genannten Substanzen im Rahmen von klinischen Studien führt aber leider nicht zwangsläufig bei allen Patienten zu einer Milderung der Krankheitssymptome. So zeigte die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Valproinsäure (VPA) etwa nur bei einem Drittel der Patienten den gewünschten Erfolg (Steigerung der *SMN2* Transkriptmenge), während bei den übrigen Patienten kein Effekt zu messen war oder die *SMN2* Transkriptmenge sogar abnahm. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass bislang keine Therapie zur Verfügung steht von der tatsächlich alle SMA-Patienten profitieren. Die Entwicklung und Testung von weiteren Substanzen sowie der Einsatz von alternativen Therapieansätzen und Trainingsmaßnahmen wird jedoch in Zukunft die Therapiemöglichkeiten für die SMA verbessern. Hierfür sind jedoch auch noch genauere Kenntnisse der *SMN2*-Genregulation nötig, diese könnten dann möglicherweise die Entwicklung individueller Therapieansätze für einzelne Patienten ermöglichen.

2.15 Zielsetzung der Arbeit

Wie beschrieben ist das *SMN2*-Gen ein vielversprechendes Zielgen für eine Behandlung und mögliche Therapie der SMA. Das Wissen über die genaue Regulation der Expression dieses Gens und mögliche epigenetische Regulationsmechanismen ist bislang lückenhaft. Durch die im Rahmen meiner Diplomarbeit geleisteten Vorarbeiten (siehe Abschnitt 4) konnte ich zeigen, dass das *SMN2*-Gen Methylierung im Promotorbereich aufweist und dass der demethylierende Wirkstoff 5'-Aza-2'-Deoxycytidin in der Lage ist die *SMN2*-Expression in Fibroblasten zu steigern. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die DNA-Methylierung die Expression des *SMN2*-Gens regulieren kann.

In den weiteren Untersuchungen sollte nun untersucht werden, ob die Promotoraktivität des *SMN*-Gens tatsächlich durch Methylierung reguliert wird. Hierfür sollten zunächst Promotoraktivitätstest mit Luziferase-Konstrukten durchgeführt werden. Zur Analyse der DNA-Methylierung des *SMN2*-Gens sollte zunächst die Pyrosequenzierung nach Behandlung mit Bisulfit etabliert werden. Anschließend sollte mit Hilfe dieser Technik in unserem Patientenkollektiv die Methylierung des *SMN2*-Promotors bei Patienten untersucht werden, die an unterschiedlichen Schweregraden der SMA erkrankt sind, aber die gleiche Anzahl an *SMN2*-Genkopien aufweisen, um zu erfahren, ob die Methylierung mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert. Falls eine Regulation der Expression durch Methylierung nachgewiesen werden kann, soll der Mechanismus der Regulation näher untersucht werden und die beteiligten Proteine identifiziert werden. Darüber hinaus sollen die Eigenschaften der bisher für die Behandlung der SMA in Betracht kommenden HDAC-Inhibitoren in Bezug auf die Regulation der Expression des *SMN2*-Gens weiter untersucht werden.

Diese Ergebnisse sind wichtig für das Verständnis der Regulation der *SMN2*-Expression und die Rolle der DNA-Methylierung in der Pathogenese der SMA. Dies ist wichtig für die Erforschung und Entwicklung weiterer Substanzen zur Behandlung der SMA, welche auf der epigenetischen Aktivierung der *SMN2*-Expression beruhen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Materialien

3.1.1 Testsubstanzen

5-Aza: 5-Aza-2'-deoxycytidin (A-3656)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Apicidin: (A-8851)	<i>Sigma-Aldrich</i>
PB: Phenylbutyrat (567616)	<i>Calbiochem</i>
SAHA: Suberoylanilide Hydroxamsäure (270-288)	<i>Axxora</i>
VPA: Valproinsäure (P-4543)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Zeb: Zebularin (691400)	<i>Calbiochem</i>
Scriptaid: (S-7817)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Oxamflatin: (O3139)	<i>Sigma-Aldrich</i>
FK-228: Depsipeptide	<i>GloucesterPharmaceuticals</i>
MS-275: (382147)	<i>Calbiochem</i>
M344: (382149)	<i>Calbiochem</i>

Alle Substanzen wurden in 100% DMSO oder H₂O (Valproinsäure) gelöst.

3.1.2 Materialien

Acrylamid: Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 30%	<i>Biorad</i>
Agar: Agar (für die Bakteriologie)	<i>AppliChem</i>
Agarose	<i>Sigma</i>
Amphotericin B	<i>Biochrom</i>
Ampicillin	<i>Sigma</i>
APS: Ammonium-Persulfat	<i>AppliChem</i>

Bromphenolblau	<i>AppliChem</i>
BSA: Bovines Serum Albumin	<i>Sigma</i>
Chemikompetente Bakterien: <i>E.coli</i> TOP 10	<i>Invitrogen</i>
Coomassie: Coomassie Brilliantblau R-250	<i>AppliChem</i>
D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (+ Glukose 4500mg/l + L-Glutamin + Pyruvat)	<i>Gibco (Invitrogen)</i>
D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (+ Glukose 4500mg/l + L-Glutamin + Pyruvat)	<i>Gibco (Invitrogen)</i>
DMSO: Dimethylsulfoxid	<i>Sigma</i>
DNA-Längenstandards: DNA-Hyperladder I und IV	<i>Bioline</i>
DNA-Probenpuffer: Probenpuffer (blau)	<i>Bioline</i>
dNTPs: Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP gemischt (10mM)	<i>Bioline</i>
DOC: Deoxycholsäure	<i>Sigma</i>
Einfrierröhrchen: Cryotubes 1,8 ml	<i>Nunc</i>
Einwegspritzen: Discardit II 5ml und 20ml	<i>BD</i>
Eisessig: Essigsäure 100%	<i>Roth</i>
Ethanol	<i>Roth</i>
Filterpapier: Blottingpapier	<i>Schleicher&Schuell</i>
FKS: fetales Kälberserum	<i>Biochrom</i>
Folie: ABI-Prism Optical Adhesive Covers	<i>Applied Biosystems</i>
Gewebekulturflaschen: Gewebekulturflasche T25 und T75	<i>Greiner</i>
Gewebekulturplatten: Gewebekulturplatten 10 cm	<i>Greiner</i>
Glycerin: Glycerin 99%	<i>AppliChem</i>
Glycin	<i>AppliChem</i>
HCl: Salzsäure 32%	<i>Roth</i>
Hefeextrakt	<i>AppliChem</i>
Hela Kernextrakte: HelaScribe® Nuclear Extract	<i>Promega</i>
IGEPAL	<i>Sigma</i>

Impfösen: Impfösen 1µl	<i>Greiner</i>
Küvetten: UVette	<i>Eppendorf</i>
Low-Melting Agarose: Low melting temperature agarose	<i>Cambrex</i>
Magnesium Acetat: Magnesium Acetat Tetrahydrat	<i>Sigma-Aldrich</i>
Magnetischer Ständer: Magnetic Rack	<i>Diagenode</i>
Membran: Protan BA 83 Nitrocellulosemembran	<i>Schleicher&Schuell</i>
Methanol	<i>Roth</i>
Milchpulver: (Magermilchpulver fettarm)	<i>Stop & Shop</i>
NaCl: Natriumchlorid	<i>AppliChem</i>
NaOH: Natriumhydroxid	<i>AppliChem</i>
Nylon Membran: Hybond XL	<i>Amersham</i>
Orthophosphorsäure: Orthophosphorsäure	<i>Sigma</i>
PBS: Phosphate buffered saline Dulbecco (1x) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	<i>Biochrom</i>
PenStrep: Penicillin Streptomycin	<i>Roche</i>
Petrischalen: Petrischalen 10 cm	<i>Greiner</i>
Ponceau: Ponceau S	<i>Sigma</i>
Primer: Oligonukleotidstartermoleküle	<i>Metabion/Qiagen</i>
Protein-Standard: Precision Plus Protein Standards All Blue	<i>Biorad</i>
Reaktionsplatten: MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate	<i>Applied Biosystems</i>
Röntgenfilm: Hyperfilm ECL	<i>Amersham</i>
Salzsäure (32%)	<i>Roth</i>
SDS: Natriumdodecylsulfat	<i>AppliChem</i>
SOC-Medium: S.O.C. Medium	<i>Invitrogen</i>
β-Mercaptoethanol	<i>AppliChem</i>
Sterilfilter: Sterilfilter 0,2µm	<i>Schleicher&Schuell</i>
Streptavidin Kügelchen: Streptavidin Sepharose™	<i>Amersham</i>
SuperSignal West Pico Chemilumenscent Substrate	<i>Pierce</i>

TBE-Puffer: Tris-Borat-EDTA-Puffer	<i>AppliChem</i>
TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin	<i>AppliChem</i>
Transfektionsreagenz: Dharmafect Transfection Reagent1	<i>Thermo Fisher</i>
Transfektionsreagenz: Fugene 6 Transfection Reagent	<i>Roche</i>
Tris Acetat: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-acetat	<i>AppliChem</i>
Tris: Tris-hydroxymethyl-Aminomethan (Tris Ultra Qualität)	<i>Roth</i>
Tris-Base: Tris-hydroxymethyl-Aminomethan	<i>Sigma</i>
Trypsin: Trypsin-EDTA Lösung (1x)	<i>Sigma</i>
Trypton: Trypton (Pepton aus Casein)	<i>AppliChem</i>
Tween: Tween 20	<i>AppliChem</i>
Zellschaber	<i>Greiner</i>
Zellzählkammer	<i>Neubauer</i>
Zentrifugenröhrchen: Reaktionsgefäß 15ml und 50ml	<i>Greiner</i>

3.1.3 Verwendete Kits

EpiQuik™ DNA Methyltransferase Activity Assay Kit	<i>Epigentek</i>
EpiQuik™ Nuclear Extraction Kit I	<i>Epigentek</i>
EpiTect Bisulfite Kit	<i>Qiagen</i>
Luziferaseassay: Dual-Luciferase Reporter Assay System	<i>Promega</i>
Nucleofector Kit: Basic Nucleofector Kit Primary Fibroblasts	<i>Amaxa (Lonza)</i>
QIAamp DNA Mini Kit	<i>Qiagen</i>
QIAEXII Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i>
QIAprep Spin Miniprep Kit	<i>Qiagen</i>
QIAquick PCR Purifikation Kit	<i>Qiagen</i>
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	<i>Qiagen</i>
real-time PCR Kit: Power SYBR Green <i>real-time</i> Kit	<i>Applied Biosystems</i>

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	<i>Qiagen</i>
RNeasy Mini Kit	<i>Qiagen</i>
Sequenzierkit Big Dye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit	<i>Applied Biosystems</i>
TOPO TA Cloning: TOPO TA Expression Kit	<i>Invitrogen</i>

3.1.4 Verwendete Vektoren

pcDNA3.1/V5-His-Topo Vektor	<i>Invitrogen</i>
pGL4 Firefly-Luziferase Vektor	<i>Promega</i>
pRL-TK Renilla-Luziferase Vektor	<i>Promega</i>

3.1.5 Verwendete Enzyme

BmtI	R0658S	<i>NEB</i>
BstUI	R0518S	<i>NEB</i>
CpG Methyltransferase (M.SssI)	M0226S	<i>NEB</i>
HindIII	R0104S	<i>NEB</i>
MspA1I	R0577S	<i>NEB</i>
T4 DNA Ligase	M0202S	<i>NEB</i>
DNA Polymerase: AmpliTaq Gold		<i>Applied Biosystems</i>
DNA Polymerase: Taq Polymerase		<i>Invitrogen</i>

3.1.6 Verwendete Geräte

Agarosegelelektrophoresekammer	<i>VWR</i>
Dispergiergerät: T10 basic	<i>IKA</i>
Entwicklermaschine: Curix 60	<i>Agfa</i>
Foto-Kassette: Röntgenkassette	<i>Kisker</i>

Gel Dokumentationssystem: ChemiDoc XRS	<i>Biorad</i>
Gelelektrophoresesystem: Muligel Long	<i>Biometra</i>
Heizblock: Schüttelheizblock	<i>Eppendorf</i>
Inkubator: Hera Cell 150	<i>Heraeus</i>
Lichtmikroskop: Leica DMIL	<i>Leica</i>
Luminometer: GloMax [®] 96 Microplate Luminometer	<i>Promega</i>
Mikroplattenlesegerät: Safire2	<i>Tecan</i>
Mikroplattenschüttler: Orbis "Personal Plate Shaker"	<i>Kisker-Biotech</i>
Netzgerät: PowerPac HC Power Supply	<i>Biorad</i>
Nukleofektor: Nucleofector	<i>Amaza</i>
PAA Elektrophoresekammer: Mini-Protean3 System	<i>Biorad</i>
Pipettierhilfe: Pipetboy acu	<i>Integra Biosciences</i>
Pyrosequenzierer: PSQ96 MA Pyrosequencing System	<i>Biotage</i>
Real-time PCR Gerät: 7500 <i>real-time</i> PCR System (Taqman)	<i>Applied Biosystems</i>
Sequenziergerät: ABI 3730	<i>Applied Biosystems</i>
Spektrophotometer: BioPhotometer	<i>Eppendorf</i>
Spektrophotometer: Nanodrop ND-1000	<i>Peqlab</i>
Sterilbank: Hera Safe	<i>Heraeus</i>
Thermozykler: DNA-Engine TETRAD2	<i>MJ-Research</i>
Tischzentrifuge: Zentrifuge 5415R	<i>Eppendorf</i>
Ultraschall Sonikator: Bioruptor UCD200	<i>Diagenode</i>
UV-Crosslinker: CL-1000	<i>UVP</i>
Vakuum Prep Station: Pyro Mark Vacuum Prep Station	<i>Biotage</i>
Western-Blot Transferkammer: Mini Trans-Blot Cell	<i>Biorad</i>
Zentrifuge: Allegra X22-R	<i>Beckman Coulter</i>

3.1.7 Lösungen und Puffer

Blocklösung (6%): 25 ml TBS-Tween, 1,5 g, Milchpulver.

Bradford-Lösung 1l: 100 mg Coomassie Brilliant Blue, 100 ml Orthophosphorsäure 85%, 50 ml Ethanol 95%, ad A.dest. 1l; Filtrieren und bei 4 °C lagern.

Einfriermedium: 900 µl FKS (10%), 100 µl DMSO.

Elektrophoresepuffer (10x): 30,29 g Tris-Base, 144,13 g Glycin, 10 g SDS, ad A.dest. 1l; Auf pH 8,3 einstellen mit HCl.

Laemmli-Puffer (2x): 0,757g Tris-Base, 20 ml Glycerin (99%), 30 mg Bromphenol-blau, 6g SDS, ad A.dest 90 ml, vor Gebrauch 1/10 β-Mercaptoethanol zugeben.

LB-Agar: 7,5 g Bacto-Agar, 500 ml LB-Medium.

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, Ad A.dest. 1L, mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und Medium vor Gebrauch autoklavieren.

Medium für die Zellkultur (556,8 ml): 500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), 50 ml Fetales Kälberserum (FKS) 10%, 5 ml PenStrep, 1,8 ml Amphotericin B.

Ponceau-Färbelösung: 0,5 g Ponceau S, 1 ml Essigsäure 100%, ad A.dest 100 ml.

Ripa-Puffer: 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 0,5% DOC (Deoxycholiacid), 0,1% SDS, 50 mM Tris pH 8,6, in A.dest 50 ml.

Sammelgel (5%): 1,4 ml H₂O, 330 µl 30% Acrylamid (29:1), 250 µl 1,0 M Tris pH 6,8, 20 µl 10% SDS, 20 µl 10% APS, 3 µl TEMED.

TBS-Tween: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,5% Tween 20, ad A.dest. 2l, Auf pH 7,56 mit HCl einstellen.

Transfer-Puffer: 2,42 g Tris-Base, 11,26 g Glycin, 200 ml Methanol, ad A.dest. 1l.

Trenngel (12 %): 1,7 ml H₂O, 2,0 ml 30% Acrylamid (29:1), 1,3 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 50 µl 10% SDS, 50 µl 10% APS, 4 µl TEMED.

Annealingpuffer Pyrosequenzierung:

20 mM Tris-Acetat, 5 mM MgAc₂

Bindepuffer Pyrosequenzierung:

10 mM Tris-HCl, 2 M NaCl, 1 mM EDTA,
0,1% Tween 20

Waschpuffer Pyrosequenzierung:

10 mM Tris-Acetat

3.1.8 Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Maus α SMN, monoklonal	<i>BD Bioscience</i>
Maus α - β -Tubulin, monoklonal	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ziege α Maus IgG, Peroxidasekonjugat	<i>Dianova</i>
Kaninchen α MeCP2, polyklonal (PAb-052-050)	<i>Diagenode</i>
Kaninchen α MeCP2, (M9317)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Maus α -E2F (Ms-E2F10-PX)	<i>GeneTex</i>
Kaninchen α -GATA2 (ab22849-200)	<i>Abcam</i>

3.1.9 Die verwendeten Oligonukleotidstartermoleküle (Primer)

Tabelle 2: Primer für die Methylierungsanalyse der *SMN*-Genkopien (Pyrosequenzierung)
Y= C/T Wobblebasen Bio= Biotin am 5' Ende

Primer für die Methylierungsanalyse der <i>SMN</i> -Genkopien (Pyrosequenzierung)			
Name	Sequenz	Amplikon- größe	Annealing- temperatur
CGI 1 outer fwd	5'-GAT GTT TAA TAA AGA ATA TTG GAG-3'	642 bp	52 °C
CGI 1 outer rev	5'-AAA TAT TTA ATC CCC CAA CCT TA-3'		
CGI 1 inner 1 fwd	5'-GTT TAA TAA AGA ATA TTG GAG GTT-3'	284 bp	55 °C
CGI 1 inner 1 rev Bio	5'-Bio-CTC TAT CAC CCA AAC TAA AAT AC-3'		
CGI 1 inner 2 fwd	5'-GTA TTT TAG TTT GGG TGA TAG AG-3'	369 bp	55 °C
CGI 1 inner 2 rev Bio	5'-Bio-TTA ATC CCC CAA CCT TAT TTA TTA-3'		
seqprimer CGI 1 1.1 fwd	5'-GTT TAA TAA AGA ATA TTG GAG GTT-3'		
seqprimer CGI 1 1.2 fwd	5'-GGT TTG GTG TGG TGG TTT ATA TT-3'		
seqprimer CGI 1 1.3 fwd	5'-TTA AAA ATA TAA AAA TTA GT-3'		
seqprimer CGI 1 2.1 fwd	5'-GTA TTT TAG TTT GGG TGA TAG AG-3'		

seqprimer CGI 1 2.2 fwd	5'-AGT ATT TTG GGA TGT TAG AG-3'		
seqprimer CGI 1 2.3 fwd	5'-GGA ATA TTT TGA GTT TAG GAG TT-3'		
seqprimer CGI 1 2.4 fwd	5'-GTG TTT TTG TGG TTT TAG TTA-3'		
seqprimer CGI 1 2.5 fwd	5'-ATG GTG TTA TTG TAT TTT G-3'		
CGI 2 outer fwd	5'-TAA GGG GGA GGG GGA ATA AA-3'	382 bp	55 °C
CGI 2 outer rev	5'-ATA ATT ATC RCC CTC CCA CAT TTA-3'		
CGI 2 inner1 fwd	5'-AGA YGA GGT TTA AGT AAT ATG T-3'	261 bp	55 °C
CGI 2 inner2 rev Bio	5'-Bio-CTC AAT CCT TTC ATT TCA CTA TA-3'		
seqprimer CGI 2 1.1 fwd	5'-AGA YGA GGT TTA AGT AAT ATG T-3'		
seqprimer CGI 2 1.2 fwd	5'-AAA TAG TTG AGY GTG GTG-3'		
seqprimer CGI 2 1.3 fwd	5'-AGG TTG AGG TGG GAG GAT-3'		
seqprimer CGI 2 1.4 fwd	5'-AAG TYG AGG TTG TAG TGA GT-3'		
seqprimer CGI 2 1.5 fwd	5'-TTG TAT TTT AGT TTG AG-3'		
CGI 3 outer fwd	5'-GTG AAA TGA AAG GAT TGA GAG A-3'	560 bp	52 °C
CGI 3 outer rev	5'-CTC CCC CAC ACC AAC CAA AA-3'		
CGI 3 inner1 fwd	5'-Bio-TAA ATG TGG GAG GGY GAT AAT TAT-	253 bp	52 °C
CGI 3 inner1 rev	5'-CTA CRA CCT CAC CTA ACC TAT A-3'		
CGI 3 inner2A fwd	5'-GTA TAG GTT AGG TGA GGT YGT AG-3'	265 bp	39 °C
CGI 3 inner2A rev Bio	5'-Bio-ATA AAC AAA ATA AAC TAC TA-3'		
CGI 3 inner2B fwd Bio	5'-Bio-GTA TAG GTT AGG TGA GGT YGT AG-3'	265 bp	39 °C
CGI 3 inner2B rev	5'-ATA AAC AAA ATA AAC TAC TA-3'		
seqprimer CGI 3 1.1 fwd	5'-TAA ATG TGG GAG GGT GAT-3'		
seqprimer CGI 3 1.2 fwd	5'-GTA GAA AGC GTG AGA AGT TAT TAT-3'		
seqprimer CGI 3 1.3 fwd	5'-GTT TYG TTT TTA GAA GTT T-3'		
seqprimer CGI 3 1.4 fwd	5'-GTY GTT ATT TTT AAG AAG GG-3'		
seqprimer CGI 3 1.5 fwd	5'-TTG TTA TGG YGA TGA GTA-3'		
seqprimer CGI 3 1.6 fwd	5'-GAG TAG GAG GAT TTY GTG TT-3'		
seqprimer CGI 3 2.1 fwd	5'-GTG TAG TTT TTT TAT TA-3'		
seqprimer CGI 3 2.2 rev	5'-AAC CAC AAC TCC AAT AAA-3'		
seqprimer CGI 3 2.3 fwd	5'-TTT ATT GGA GTT GTG GTT-3'		

seqprimer CGI 3 2.4 rev	5'-CTA TCA AAA AAC CCA AAC TA-3'		
seqprimer CGI 3 2.5 rev	5'-ATA AAC AAA ATA AAC TAC TA-3'		
CGI 4 outer fwd	5'-GTG GTT TTA GTT ATT TGG AAG-3'	613 bp	52 °C
CGI 4 outer rev	5'-CTA CCA TAA ACT AAA ATC ATA CC-3'		
CGI 4 inner1A fwd	5'-GTT TAG GGA GGT GGA GGT TGT-3'	191 bp	52 °C
CGI 4 inner1A rev Bio	5'-Bio-TAT TAA CCA AAA TAA TCT-3'		
CGI 4 inner1B fwd Bio	5'-Bio-GTT TAG GGA GGT GGA GGT TGT-3'	191 bp	52 °C
CGI 4 inner1B rev	5'-TAT TAA CCA AAA TAA TCT-3'		
CGI 4 inner2A fwd	5'-AGA TTA TTT TGG TTA ATA-3'	328 bp	52 °C
CGI 4 inner2A rev Bio	5'-Bio-CCA CTA TAC TCC AAC CTA AAC C-3'		
CGI 4 inner2B fwd Bio	5'-Bio-AGA TTA TTT TGG TTA ATA-3'	328 bp	52 °C
CGI 4 inner2B rev	5'-CCA CTA TAC TCC AAC CTA AAC C-3'		
seqprimer CGI 4 1.1 fwd	5'-GTT TAG GGA GGT GGA GGT TGT-3'		
seqprimer CGI 4 1.2 fwd	5'-TGT TTT AAA ATA AAA TAA-3'		
seqprimer CGI 4 1.3 fwd	5'-AAG TTT GTA ATT TTA GTA-3'		
seqprimer CGI 4 2.1 fwd	5'-AGA TTA TTT TGG TT-3'		
seqprimer CGI 4 2.2 rev	5'-CTT CAT AAC ATT CTC CTA-3'		
seqprimer CGI 4 2.3 fwd	5'-TAG GAG AAT GTT ATG AAG-3'		
seqprimer CGI 4 2.4 fwd	5'-TTA TTG TAT TTT AGT TTG GG-3'		
seqprimer CGI 4 2.5 rev	5'-ATT CCT TAA AAT ATA CCTA-3'		
seqprimer CGI 4 2.6 rev	5'-CTA TAC TCC AAC CTA AAC CAC AA-3'		

Tabelle 3: Primer für die Methylierungsanalyse der *SMN*-Genkopien (Klonierung und Sequenzierung) Y= C/T Wobble basen

Primer für die Methylierungsanalyse (Klonierung und Sequenzierung)			
Name	Sequenz	Amplikon- größe	Annealing- temperatur
CGI1 cloning fwd	5'-TGT AAT TTT AGT ATT TTG GGA GGT-3'	589 bp	58 °C
CGI1 cloning rev	5'-TTA ATC CCC CAA CCT TAT TTA TTA-3'		
CGI2 cloning fwd	5'-GAG TTY GAG AYG AGG TTT AAG T-3'	314 bp	60 °C
CGI2 cloning rev	5'-CTA CGA CCT CAC CTA ACC TAT A-3'		
CGI3 cloning fwd	5'-TAA ATG TGG GAG GGC GAT AAT TAT-3'	253 bp	60 °C
CGI3 cloning rev	5'-AAA AAT AAA CAA AAT AAA CTA CTA-3'		
CGI4 cloning outer fwd	5'-TAG TTA TTT GGA AGG TTT AGG TT-3'	614 bp	58 °C
CGI4 cloning outer rev	5'-ATA ACT CAC TCC TTT AAA CCC AA-3'		
CGI4 cloning inner fwd	5'-GTT TAG GGA GGT GGA GGT TGT-3'	501 bp	62 °C
CGI4 cloning inner rev	5'-CCA CTA TAC TCC AAC CTA AAC C-3'		

Tabelle 4: *real-time* PCR Primer zur Analyse der Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)

Primer für die Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) Analysen			
Name	Sequenz	Amplikon- größe	Annealing- temperatur
-631 to -524 fwd	5'-GTG TTT AAG GAT CTG CCG CCT-3'	106 bp	55 °C
-631 to -524 rev	5'-GTA AAT GTA AGC TCC TAC TAG GAA-3'		
-609 to -487 fwd	5'-CCT TCC TGC CCC CAT GTT TGT-3'	121 bp	55 °C
-609 to -487 rev	5'-TGT GTG TAG ATA TTT ATT CCC C-3'		
-449 to -349 fwd	5'-GTT CGA GAC GAG GCC TAA GCA-3'	100 bp	55 °C
-449 to -349 rev	5'-CCC CAG TAG CTA GGA CTA TAG GCG-3'		
-372 to -266 fwd	5'-CGC CTA TAG TCC TAG CTA CTG GG-3'	105 bp	55 °C
-372 to -266 rev	5'-GCT CAG GCT GGA GTG CAG C-3'		
-167 to -43 fwd	5'-CAC GCC ACA AAT GTG GGA GG-3'	123 bp	55 °C
-167 to -43 rev	5'-AAG AGT GAC GAC TTC CGC CG-3'		
-63 to +59 fwd	5'-CGG CGG AAG TCG TCA CTC TT-3'	122 bp	55 °C
-63 to +59 rev	5'-CAG CAC GGA ATC CTC CTG CT-3'		

Tabelle 5: Primer für die Methylierungsanalyse des murinen *Smn*-Gens durch Pyrosequencing Y= C/T Wobble basen Bio= Biotin am 5' Ende

Primer für Methylierungsanalyse des murinen <i>Smn</i> Gens			
Name	Sequenz	Amplikon- größe	Annealing- temperatur
Smn outer fwd 1	5'-ATA GAT GTG GGA GGA GTG A-3'	393 bp	55°C
Smn outer rev 1	5'-CTT ACT TCA ACC AAC CTA TC-3'		
Smn inner fwd 1	5'-TAG GAG GTT TTT GGT TGT TT-3'	323 bp	55°C
Smn inner rev1	5'-Bio-CTC ACA ATC ACA CAA AAC CAA-3'		
Smn Seq Primer 2	5'-GTT TTA GAA GTT TTA TGA-3'		
Smn Seq Primer 3	5'-TTA TTG AGT GAG TTY GGT A-3'		
Smn Seq Primer 4	5'-GTT ATG GYG ATG GGT AGT G-3'		
Smn Seq Primer 5	5'-GGT TTY GAG TAG GAA GAT-3'		
Smn Seq Primer 6	5'-GGT ATY GGT TAG GTG AGG-3'		
Smn Seq Primer 7	5'-TTA GTA TTY GGA GYG TTG T-3'		
Smn Seq Primer 8	5'-TGY GAG TTY GGG TTA TAT-3'		
Smn Seq Primer 9	5'-GGY GGT TTT TGG TGT AGT-3'		

Tabelle 6: Sonstige Primer(*Primer*), Y= C/T Wobblebasen * Größe für cDNA bzw. genomische DNA

Sonstige Primer und Oligonukleotide			
Name	Sequenz	Amplikon- größe	Annealing- temperatur
β-actin-fwd	5'-AAC GGC TCC GGC ATG TGC AA-3'	341	55 °C
β-actin-rev	5'-CTC AAA CAT GAT CTG GGT CAT CTT-3'		
CDK-4-fwd	5'-CTA TGG GAC AGT GTA CAA GG-3'	262 bp* 420 bp*	55 °C
CDK-4-rev	5'-GAT ATG TCC TTA GGT CCT GG-3'		
LT-SMN2-279-fwd	5'-ACT CCA GCC TGA GCG ACA-3'	151 bp	55 °C
LT-SMN2-128-rev	5'-TCT ACG AGT GGT TAT CGC-3'		
LT-SMN2-275-fwd	5'-AGC CTG AGC GAC AGG GCGA-3'	364 bp	55 °C
LT-SMN2+90-rev	5'-ATC ATC GCT CTG GCC TGT GCC-3'		
RV3 Seq Primer	5'-TAG CAA AAT AGG CTG TCC C-3'		
SMN PR FWD -476	5'-AAA TTT GCT AGC CTG GAG TTC GAG ACG AGG CC-3'	487 bp	70 °C
SMN PR REV -13	5'-AAA TTT AAG CTT GGT GCG CAG CGT GGG GCC CC-3'		
EMSA Fwd Bio	5'Bio-TGAGCCCAAGAAGTCGAGGCTGCAGTGAGC-CGAGATCGCGCCGCTGCACTCCAGCCTGAG-3'		
EMSA Fwd Bio	5'Bio-CTCAGGCTGGAGTGCAGCGGCGCGATCTCG-GCTCACTGCAGCCTCGACTTCTTGGGCTCA-3'		

Tabelle 7: Die verwendeten Primer für die *real-time* PCR. Alle Primer außer die *LT-SMN* Primer (*Metabion*) wurden von *Qiagen* bezogen.

Primer für die <i>real-time</i> PCR				
Gen	Bezeichnung (<i>Qiagen</i>)	Artikelnummer (<i>Qiagen</i>)	Amplikon -größe	Annealing- temperatur
<i>SMN1/2</i>	Hs_SMN2_2_SG	QT01673679	97 bp	55°C
<i>ACTB</i>	Hs_ACTB_SG_1	QT00095431	146 bp	55°C
<i>HDAC 1</i>	Hs_HDAC1_1_SG	QT00015239	140 bp	55°C
<i>HDAC 2</i>	Hs_HDAC2_1_SG	QT00001890	127 bp	55°C
<i>HDAC 3</i>	Hs_HDAC3_1_SG	QT00093730	100 bp	55°C
<i>HDAC 4</i>	Hs_HDAC4_1_SG	QT00005810	86 bp	55°C
<i>HDAC 5</i>	Hs_HDAC5_1_SG	QT00060585	145 bp	55°C
<i>HDAC 6</i>	Hs_HDAC6_1_SG	QT00002709	64 bp	55°C
<i>HDAC 7</i>	Hs_HDAC7_1_SG	QT00031822	121 bp	55°C
<i>HDAC 8</i>	Hs_HDAC8_1_SG	QT00049630	91 bp	55°C
<i>HDAC 9</i>	Hs_HDAC9_1_SG	QT00039333	92 bp	55°C
<i>HDAC 10</i>	Hs_HDAC10_1_SG	QT00007252	161 bp	55°C
<i>HDAC 11</i>	Hs_HDAC11_2_SG	QT01674617	65 bp	55°C
<i>MECP2</i>	Hs_MECP2_1_SG	QT00039361	60 bp	55°C
<i>E2F1</i>	Hs_E2F1_1_SG	QT00016163	73 bp	55°C
<i>LT-SMN</i>	LT-SMN Fwd 1B	5'-ACT CCA GCC TGA GCG ACA-3'	151 bp	55°C
<i>LT-SMN</i>	LT-SMN Rev 2B	5'-TCT ACG AGT GGT TAT CGC -3'		

Tabelle 8: Verwendete siRNAs (alle von *Qiagen* außer Transfection control von *Dharmacon*)

Verwendete antisense RNAs (siRNAs)			
Gen	Name	Artikelnummer	Zielsequenz
HDAC 1	HDAC1_6	SI02663472	CACCCGGAGGAAAGTCTGTTA
HDAC 2	HDAC2_4	SI00434973	GACCCATAACTTGCTGTAA
HDAC 3	HDAC3_1	SI00057316	CAGCCGGTTATCAACCAGGTA
HDAC 4	HDAC4_4	SI00083958	TTGCGTCTTATTGAACTTATT
HDAC 5	HDAC5_5	SI03060330	CACGCTAGAGAAAGTCATCGA
HDAC 6	HDAC6_5	SI02663808	CACCGTCAACGTGGCATGGAA
HDAC 7	HDAC7A_5	SI02777719	AAGGCTGGAAACAGAAACCCA
HDAC 8	HDAC8_5	SI03049382	ATGAGGATAGTTAAGCCTAAA
HDAC 9	HDAC9_5	SI03025071	TTGGCTCAGCTGGTCATTCAA
HDAC 10	HDAC10_1	SI00141736	CAGGTGAACAGTGGTATAGCA
HDAC 11	HDAC11_7	SI03105186	GCGAGACTTCATGGACGACAA
MECP2	MeCP2_7	SI02664893	ACGGAGCGGATTGCAAAGCAA
E2F1	E2F1_6	SI02664410	ACGCTATGACCTCACTGAA
Control siRNA	AllStars Neg.Control siRNA	1027281	vom Hersteller nicht angegeben
Transfection control	siCONTROL TOX	D-001500-01-20	vom Hersteller nicht angegeben

3.1.10 Verwendete Internetadressen/Software

CpG-Report / CpG-Plot Emboss	www.EBI.ac.uk/emboss
Genome Browser Ensembl	www.ensembl.org
Genome Browser UCSC	www.genome.org
Transcription Element Search Software TESS	www.cbil.upenn.edu/tess/

Software zur densitometrische Quantifizierung: Quantity One	<i>Biorad</i>
Software für die <i>real-time</i> PCR: 7500 System SDS V1.2	<i>ABI</i>
Software für die Methylierungsanalyse: PyroQCpG Software	<i>Biotage</i>
Software zur Sequenzanalyse: DNA Star 7	<i>Lasergene</i>
Software zur Sequenzanalyse: FinchTV	<i>Geospiza</i>
Software zur Sequenzanalyse: Sequence Scanner V1.0	<i>ABI</i>
Textverarbeitung: Word 2003	<i>Microsoft</i>
Tabellenkalulation: Excel 2003	<i>Microsoft</i>
Bildbearbeitung: Powerpoint 2003	<i>Microsoft</i>
Referenzverwaltung: Endnote 9	<i>Thomson</i>

3.1.11 Verwendete Zelllinien

3.1.11.1 SMA Fibroblastenzelllinien

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die bereits gut charakterisierten SMA Fibroblastenzelllinien ML5, ML16, ML17 und ML22 sowie die neue Zelllinie ML74 verwendet. Bei diesen Zelllinien handelt es sich um primäre Fibroblasten, welche aus Hautbiopsaten von SMA-Patienten gewonnen wurden. Alle Zelllinien wurden mir von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Wirth zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien stammen von SMA-Patienten für die ein homozygoter Verlust des *SMN1*-Gens nachgewiesen werden konnte (Brichta, et al. 2003).

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten SMA-Fibroblastenzelllinien

DNA-Nummer	Zelllinie	Geschlecht	Phänotyp	SMN2-Kopien	SMN1-Kopien
785	ML5	m	SMA Typ 2	3	keine
4043	ML16	m	SMA Typ 1	3	keine
3413	ML17	w	SMA Typ 1	2	keine
1582	ML22	m	SMA Typ 3a	2	keine
4929	ML74	m	SMA Typ 3b	2	keine

3.1.11.2 Weitere humane Zelllinien

Neben den beschriebenen SMA-Fibroblastenzelllinien wurde auch eine humane Vorhaut-Fibroblasten-Zelllinie verwendet, die aus der Zirkumzision eines gesunden Spenders gewonnen wurde. Außerdem wurden HEK293T Zellen verwendet. Diese Zellen stammen aus der Niere eines humanen Embryos (*human embryonic kidney cells*) und tragen das SV-40 T-Antigen. Sie sind daher besonders für Transfektionsexperimente gut geeigneten. Die HEK293T Zellen wurden mir freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Kubisch zur Verfügung gestellt.

3.1.12 Verwendete DNAs aus Blutproben

Tabelle 10 Liste der Verwendeten Patientenproben (DNAs aus Blutproben). Alle DNA Proben stammen aus dem Patientenkollektiv von Frau Prof. Dr. Wirth.

DNA-Nummer	Geschlecht	Phänotyp	SMN2-Kopien	SMN1-Kopien
5202	männlich	SMA Typ1	2	keine
5206	weiblich	SMA Typ1	2	keine
5197	weiblich	SMA Typ1	2	keine
5354	männlich	SMA Typ1	2	keine
5355	weiblich	SMA Typ1	2	keine

5414	weiblich	SMA Typ1	2	keine
6827	männlich	SMA Typ1	2	keine
6926	weiblich	SMA Typ1	2	keine
7012	weiblich	SMA Typ1	2	keine
7522	männlich	SMA Typ1	2	keine
509	männlich	SMA Typ3b	2	keine
1782	männlich	SMA Typ3a	2	keine
2318	weiblich	SMA Typ3a	2	keine
2331	weiblich	SMA Typ3b	2	keine
2397	männlich	SMA Typ3a	2	keine
4639	weiblich	SMA Typ3a	2	keine
5019	weiblich	SMA Typ3a	2	keine
156	weiblich	gesund	keine	2
454	männlich	gesund	keine	2
4987	weiblich	gesund	keine	2
5423	weiblich	gesund	keine	2
6106	männlich	gesund	keine	2
8564	weiblich	gesund	keine	2
7F	weiblich	gesund	keine	2
2293	männlich	SMA Typ1	keine	2
2730	weiblich	SMA	keine	2
2897	weiblich	SMA	keine	2
3612	männlich	SMA Typ1	keine	2
5693	weiblich	SMA Typ1	keine	2
153	weiblich	gesund	3	keine
155	weiblich	gesund	3	keine
157	männlich	SMA Typ3a	3	keine
2023	weiblich	gesund	3	keine
2024	weiblich	gesund	3	keine
2026	männlich	SMA Typ3b	3	keine

2027	männlich	SMA Typ3b	3	keine
7126	weiblich	SMA Typ3b	nicht bestimmt	keine
7128	männlich	gesund	2	keine
7129	männlich	gesund	2	keine

3.1.13 Biologisches Material

Die Expressionsanalysen in humanem embryonalem Gewebe erfolgte in RNA aus einem Abort Embryo mit Trisomie 21. Die RNA Proben wurden mir freundlicherweise von Frau S. Kröber aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Wirth zur Verfügung gestellt.

3.1.14 SMA-Mausmodelle und murine Zelllinien

Zwei SMA-Mausmodelle wurden für die Analysen im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet diese können direkt vom *Jackson's Laboratory* bezogen werden. Diesen Mäusen fehlt ein funktionelles murines *Smn*-Gen welches homolog zum humanen *SMN1*-Gen ist. Da jedoch der homologe Verlust des *Smn*-Gens embryonal letal ist, tragen die SMA-Mausmodelle das humane *SMN2* als Transgen. Die verwendeten SMA-Mausmodelle aus den Arbeitsgruppen von Arthur Burghes (Burghes-Mäuse; Jackson's Laboratory, Stock Number 005024) (Monani, et al. 2000) und Hung Li (Hung-Mäuse; Jackson's Laboratory, Stock Number 001800) (Hsieh-Li, et al. 2000) sollen hier kurz näher beschrieben werden. Die Burghes-Mäuse tragen ein Transgen, das nur das humane *SMN2*-Gen als genomisches BamH1 Fragment enthält. Die Hung-Mäuse hingegen tragen ein größeres Transgen welches neben dem *SMN2*-Gen auch noch das *SERF1*-Gen und Teile des *NAIP*-Gens trägt. Die hier verwendeten Mausstämme tragen im homozygoten Zustand 2 *SMN2*-Genkopien (Burghes Mäuse) bzw. 4 *SMN2* (Hung Mäuse) da diese Stämme eine bzw. zwei *SMN2*-Gene (Hung Mäuse) pro Transgen aufweisen.

Die verwendeten Burghes-Mäuse stehen in unserem Institut auf dem FVB Hintergrund zur Verfügung. Die homozygoten Tiere auf diesem Hintergrund (*Smn*^{-/-}, *SMN2*^{tg/tg}) kommen nicht lebend zur Welt, die verwendete Zelllinie PMEF#14 stammt von so einem Tier. Für die übrigen Versuche mit diesem SMA-Mausmodell wurden weibliche Tiere verwendet die heterozygot für das murine *Smn*-Gen sind und

homozygot für das *SMN2*-Transgen sind (*Smn*^{+/-}, *SMN2*^{tg/tg}). Diese Tiere tragen also 2 *SMN2*-Genkopien sowie ein *Smn*-Gen und zeigen daher keine Krankheitssymptome. Die verwendeten Hung-Mäuse (*Smn*^{+/-}, *SMN2*^{tg/tg}) waren ebenfalls heterozygot für das *Smn*-Gen und trugen 2 *SMN2*-Transgene (4 *SMN2*-Kopien). Die Tiere mit diesem Genotyp zeigen ebenfalls keine Symptome und entsprechen damit den menschlichen Anlageträgern (*Carrier*). Auch bei homozygoter Deletion des *Smn*-Gens zeigen die Tiere mit 4 *SMN2*-Genkopien außer einer Verkürzung des Schwanzes keinen Phänotyp. Hingegen sterben die Tiere mit homozygoter Deletion des murinen *Smn*-Gens, welche nur eine Kopie des Transgens tragen (*Smn*^{+/-}, *SMN2*^{tg/-}) nach 9,9 Tagen, entsprechen also einem schweren Verlauf der SMA. Die verwendeten Mäuse bzw. die aus diesen Tieren gewonnenen Organe und Zelllinien wurden mir von Herrn Dipl. Biol. M. Rießland aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Wirth zur Verfügung gestellt und sind in seiner Doktorarbeit, die ebenfalls 2009 am Institut für Humangenetik angefertigt wurde, genauer beschrieben.

3.2 Methoden

3.2.1 Organotypische, hippokampale Hirnschnittkulturen des Menschen

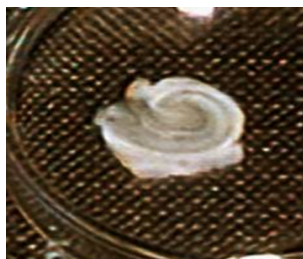


Abbildung 5: Ein humaner Hirnschnitt, gewonnen aus einer epilepsiechirurgischen Hippokampusresektion. Organotypische Hirnschnittkulturen werden auf Membranen (*BD Biosciences*, Porengröße 400 µm) kultiviert, über die sie Kontakt zum Kulturmedium haben. Die Kulturdauer beträgt insgesamt 72 Stunden (Abbildung von Dr. Hahnen).

Für die Untersuchung potentieller Wirkstoffe zur Behandlung der SMA wurden organotypische hippokampale Hirnschnittkulturen (OHSCs) des Menschen verwendet. Die Hirnschnittkulturen stammen aus epilepsiechirurgischen Eingriffen, die an der Neurochirurgischen Klinik der Universität Erlangen durchgeführt wurden (Dr. Ilker Eyüpoglu, Dr. Johann Romstöck). Sie wurden im Lehrstuhl für Neuropathologie der Universität Erlangen (Prof. Dr. Ingmar Blümcke) aufbereitet und in Kultur genommen. Hierzu wurden die Gewebeproben unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff mit Hilfe eines Vibratoms (*Leica Microsystems*) in 350 µm dünne Hirnschnitte geteilt. Dafür ist es notwendig, die Schnittebene so zu wählen,

dass die ableitenden Nervenbahnen innerhalb des Hippokampus erhalten bleiben und die vorhandenen Nervenzellen überleben können. Die Hirnschnitte wurden auf eine Membran überführt, über die sie Kontakt zum Zellkulturmedium hatten, und im weiteren Verlauf in 6-well Platten kultiviert. 24 Stunden nach Präparation wurde das Kulturmedium gewechselt. Anschließend wurden die Testsubstanzen zugegeben und die Hirnschnitte für 48 Stunden mit diesen inkubiert. Ein humaner hippokampaler Hirnschnitt ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Präparation und Kultivierung hippokampaler Hirnschnittkulturen des Menschen entsprechen der Präparation und Kultivierung hippokampaler Hirnschnittkulturen der Ratte (Eyupoglu, et al. 2005, Eyupoglu, et al. 2005, Hahnen, et al. 2006). Mit den organotypischen Hirnschnittkulturen steht uns ein wertvolles System zur Verfügung, mit dessen Hilfe die Wirkung von Substanzen *ex vivo* an humanem, neuronalem Gewebe untersucht werden kann.

3.2.2 DNA-Isolation aus Blutproben von SMA-Patienten

Alle Patienten erfüllen die diagnostischen Kriterien für SMA (Munsat, et al. 1992). Der Schweregrad der Erkrankung (Typ I SMA, MIM #253300; Typ II SMA, MIM #253550; Typ IIIa/IIIb SMA, MIM #253400) wurde wie beschrieben klassifiziert (Munsat, et al. 1992). Die genomische DNA wurde aus Vollblutproben, die für diagnostische und Forschungszwecke in der AG von Frau Prof. Dr. Wirth genommen wurden, mit Hilfe der Aussalzmethode in unserer Diagnostischen Abteilung gewonnen. Die Anzahl der *SMN1/SMN2* Genkopien wurde mittels standardisierter quantitativer *real-time-PCR* wie in (Zerres, et al. 1995) beschrieben von Herrn Blick und Frau Zimmermann aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Wirth bestimmt.

3.2.3 Zellkultur

Alle Arbeiten mit den eukaryotischen Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen, um Kontaminationen der Zellkulturen mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden. Außerdem wurden dem Zellkulturmedium Antibiotika (Penicillin, Streptomycin) sowie das pilzhemmende Amphotericin B zugesetzt.

3.2.3.1 Auftauen von Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff bei -196°C in Einfrierröhrchen. Zum Schutz der Zellen werden diese in einem Gemisch aus 90% FKS und 10% DMSO (Einfriermedium) eingefroren. Um die Zellen möglichst schonend aufzutauen, wurden die Cryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und sofort auf Eis überführt. Anschließend wurden die gefrorenen Zellen mit 37°C warmem Medium überschichtet, um ein schnelles Auftauen der Zellen zu gewährleisten. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 8 Minuten bei 1100 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml des vorgewärmten Kulturmediums resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Gewebekulturflaschen (T25) überführt und mit weiteren 4 ml des Zellkulturmediums (D-MEM Dulbecco's Modified Eagle Medium) versetzt. Die Flaschen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

3.2.3.2 Splitten von Zellen

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärent einzellschichtig wachsende Zellen, die ihr Wachstum auf Grund von lateraler Kontaktinhibition einstellen. Konfluente bzw. nahezu konfluente Zellkulturen (80%) wurden gesplittet, d.h. auf mehrere Kulturflaschen verteilt. Hierfür wurde zunächst das alte Kulturmedium entfernt, und die Zellen wurden mit 5 ml 1x PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen. Hierdurch wurden Zelltrümmer, tote Zellen sowie die Calcium- und Magnesium-Ionen entfernt, mit deren Hilfe die Zellen an den Gewebekulturflaschen haften können. Um die Zellen abzulösen, wurden sie mit 2,5 ml Trypsin-EDTA Lösung versetzt und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit löst das Trypsin den Kontakt der Zellen zur Kulturflasche enzymatisch auf. Ein vollständiges Ablösen der trypsinisierten Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 ml Medium abgestoppt, um Zellschäden durch Proteolyse zu verhindern. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf mehrere neue Gewebekulturflaschen verteilt und mit Medium auf das Ausgangsvolumen (12 ml bei 75 cm^2 Flaschen) aufgefüllt. Dabei richtete sich die Anzahl der Flaschen (Splittingverhältnis) nach der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Schnell wachsende Zellen wurden 1:4 gesplittet, während langsam

wachsende Zellen nur 1:2 gesplittet wurden. Die Zellen wurden anschließend wieder in den Inkubator überführt.

3.2.3.3 Einfrieren von Zellen

Um Zellen dauerhaft zu lagern, werden diese in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt. Damit die Zellen bei diesen Temperaturen gelagert werden können, müssen sie gegen Eiskristallbildung geschützt werden, um Membranschädigungen zu verhindern. Hierfür wurde zunächst ein Einfriermedium aus 90% FKS und 10% DMSO hergestellt und steril filtriert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben trypsinisiert, anschließend aber in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1ml des Einfriermediums resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in 1ml Einfrier Röhrchen überführt und die Zellen über Nacht bei -80°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Cryogefrier Röhrchen in flüssigem Stickstoff überführt wo sie bei -196°C bis zur Verwendung gelagert wurden.

3.2.3.4 Behandlung von Zellen mit den Testsubstanzen

Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollte unter anderem in Fibroblasten der Zelllinie ML17 die Expression des *SMN2*-Gens nach Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen untersucht werden. Um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde immer eine definierte Zellzahl mit einer genau definierten Menge an Wirkstoff behandelt. Außerdem befanden sich die Zellen zum Zeitpunkt der Behandlung immer in der linearen Wachstumsphase, was Einflüsse durch Unterschiede im Stoffwechselstatus ausschließt. Daher wurden für die Behandlung der Zellen jeweils Zellen der gleichen Zelllinie und Passage, wie oben beschrieben, trypsinisiert und die suspendierten Zellen in eine Zellkulturflasche überführt. Die Zellkonzentration wurde durch Auszählung in der Zählkammer bestimmt und die Zellen mit dem Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Für die Behandlung in 10 cm^2 Kulturplatten wurden, falls nicht anders angegeben, $2 \cdot 10^5$ Zellen in einem Kulturvolumen von 8 ml eingesetzt. Die Behandlung erfolgte mit 8 μl des in DMSO oder H_2O gelösten, 1000-fach konzentrierten Wirkstoffs. Die Kontrollkulturen wurden jeweils mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels

behandelt. Die Gewebekulturplatten wurden dann je nach gewünschter Behandlungsdauer im Inkubator aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen je nach Verwendungszweck wie beschrieben weiterverwendet.

3.2.4 Isolation von DNA

Die Isolation der DNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels QIAamp DNA Mini Kit (*Qiagen*) nach Protokoll des Herstellers. Die Zellen wurden zunächst auf den Gewebekulturplatten mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber von der Gewebekulturplatte abgelöst. Die Zellen wurden bei 800 U/min in der Tischzentrifuge pelletiert (5 min). Das Pellet wurde in 200 µl PBS aufgenommen und mit 20 µl Proteinase K Lösung versetzt. Anschließend wurden 200 µl Lysis Puffer (AL-Puffer) hinzugefügt und die Probe für 15 Sekunden gemischt. Danach wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 56 °C im Heizblock inkubiert und mit 200 µl Ethanol 100% versetzt. Die Probe wurde auf eine QIAamp Mini Säule in einem 2 ml Reaktionsgefäß aufgetragen und bei 8000 U/min für 1 Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule jeweils mit 500 µl Puffer AW1 und AW2 gewaschen. Schließlich wurde die DNA mit 50 µl destilliertem und autoklaviertem Wasser eluiert.

3.2.5 Isolation von RNA

Die Isolation der RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels RNeasy Mini Kit (*Qiagen*) nach Protokoll des Herstellers. Die Zellen auf den Gewebekulturschalen wurden zunächst mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf der Gewebekulturschale mit 600 µl des Lysispuffers RLT versetzt. Die Zelllysate wurden mit einem Zellschaber eingeengt, auf eine QIAshredder Mini Säule aufgetragen und für 2 Minuten bei 13.200 U/min zentrifugiert. Das homogenisierte Lysat wurde anschließend mit 600 µl 70% Ethanol versetzt und auf die RNeasy Mini Säule aufgetragen. Die RNA wurde durch Zentrifugation (13.200 U/min für 1 Minute) an die Säulenmatrix gebunden. Danach wurde die Säule einmal mit RW1-Puffer und RPE-Puffer gewaschen. Die RNA wurde schließlich in 50 µl RNase-freiem Wasser oder TE-Puffer eluiert.

Die Isolation von RNA aus Hirnschnitten erfolgte mittels RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (*Qiagen*). Die Proben wurden hierfür zunächst mit QIAzol-Lysispuffer versetzt und durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Dem Lysat wurden 200 µl Chloroform

zugesetzt und das Gemisch für 15 Minuten bei 13.200 U/min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und mit 600 µl 70% Ethanol versetzt. Die weitere Prozedur erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der in Wasser gelösten DNA wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt, da hier das Absorptionsmaximum der DNA liegt. Die Extinktion, also der Anteil des Lichts, der von der Lösung absorbiert wird, ist abhängig von der Schichtdicke der Meßküvette und der Konzentration des gelösten Stoffes. Eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die DNA-Konzentration wurde durch Messung mit dem Nanodrop ND1000 System (*Peqlab*) bestimmt. Die Reinheit wurde über das Absorptionsverhältnis A260/A280 gemessen und lag im Bereich von 1,7 - 1,9.

3.2.7 Amplifikation von Nukleinsäuren (Polymerase-Kettenreaktion, PCR)

Die 1983 von K. B. Mullis entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die Amplifikation von spezifischen DNA Abschnitten. Die hierfür verwendete DNA Polymerase ist in der Lage, einzelsträngige DNA als Matrize zu verwenden und den komplementären Strang durch den Einbau von freien Nukleotiden zu synthetisieren. Neben der einzelsträngigen DNA als Matrize benötigt die DNA-Polymerase freie 3'-Hydroxylgruppen für die Synthese des Komplementärstranges. Daher sind für die PCR sogenannte Oligonukleotidstartermoleküle (Primer) mit freien OH-Gruppen am 3'-Ende erforderlich. Um eine exponentielle Vervielfältigung der DNA-Sequenz zu ermöglichen, werden Vorwärts- und Rückwärtsprimer verwendet. Der Vorwärts-Primer (fwd-Primer) bindet im Bereich stromaufwärts vor der zu amplifizierenden Sequenz am komplementären Gegenstrang, während der Rückwärts (rev-Primer) am Sinnstrang hinter dieser bindet. Vom fwd-Primer aus wird also der Sinnstrang synthetisiert, während vom rev-Primer aus der komplementäre Gegenstrang gebildet wird. Als Matrize für die PCR dient in der Regel doppelsträngige DNA, die zunächst durch Hitzedenaturierung bei 95°C in die komplementären Tochterstränge aufgetrennt wird. Anschließend wird der Reaktionsansatz auf eine Temperatur gebracht, welche die Hybridisierung der Primer mit der Template-DNA ermöglicht. Danach wird der komplementäre Strang ausgehend von den 3'OH Enden der Primer

synthetisiert. Die üblicherweise verwendete Taq-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) arbeitet bei einer Synthesetemperatur von 72 °C. Die Synthesezeit wird je nach Größe des PCR-Produkts gewählt. Die drei Schritte der PCR werden im Normalfall bis zu 35-mal wiederholt. Dies führt zu einer exponentiellen Amplifikation des PCR-Produktes, da sich die Produktmenge mit jedem PCR Zyklus verdoppelt.

3.2.8 Bisulfitbehandlung von genomischer DNA

Die Bisulfitbehandlung von DNA ermöglicht in Kombination mit einer PCR die Unterscheidung von methylierten und nicht methylierten Cytosinen in mehreren hundert Basenpaaren großen DNA Abschnitten. Die Arbeitsschritte sind schematisch in Abbildung 6 dargestellt. Zunächst werden alle unmethylierten Cytosinreste durch die Bisulfitbehandlung in Uracilreste umgewandelt, was wiederum in der PCR zum Einbau von T statt C im Sinnstrang führt. Die methylierten Cytosinreste sind im Gegensatz dazu gegen eine Umwandlung inert und können daher später bei der Sequenzierung noch als Cytosine erkannt werden.

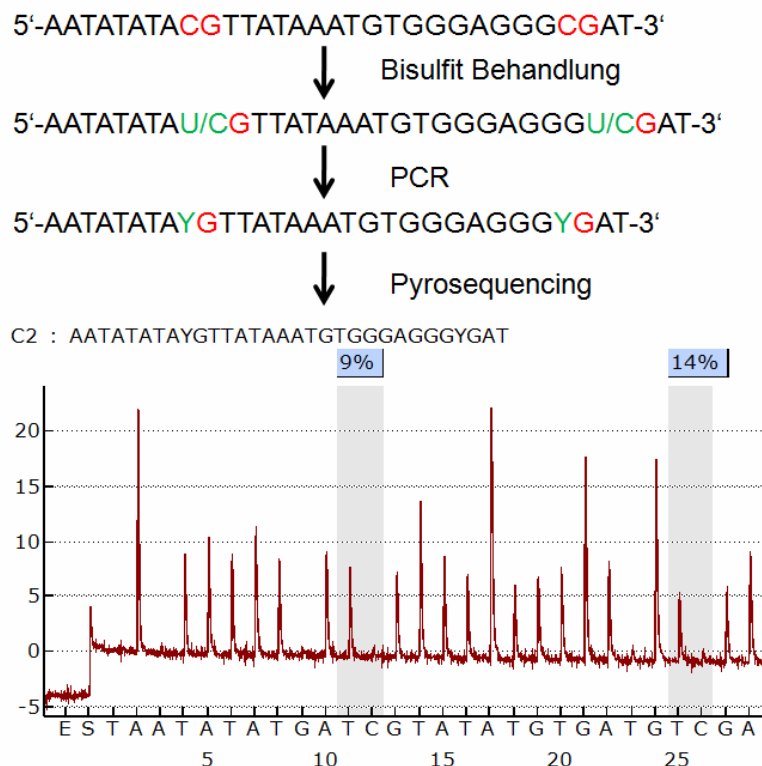


Abbildung 6 Schematische Übersicht über die Arbeitsschritte bei der genomischen Sequenzierung mittels Pyrosequenzierung nach der Bisulfit-Methode. Die hier analysierte DNA Probe weist nur sehr geringe Methylierungswerte auf, daher sind im Pyrogramm an den analysierten Positionen nur Peaks nach der Zugabe Thymidin zu erkennen.

Die Umwandlung der Pyrimidinbase Desoxycytidin in Desoxyuridin durch die Bisulfit-Behandlung erfolgt in einem dreistufigen Prozess. Das Natriumhydrogensulfit (Bisulfit) liegt im festen Zustand als Natriummetahydrogensulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) vor. In wässriger Lösung hydratisiert es zu NaHSO_3 und liegt in saurer Lösung (pH 5) als HSO_3^- -Ion vor. Im ersten Schritt der Bisulfitbehandlung wird das HSO_3^- -Ion an die Position 6 des Pyrimidinringes addiert. Es entsteht 5,6-Dihydrodesoxycytidin-6-sulphonat, welches im zweiten Schritt durch hydrolytische Desaminierung in 5,6-Dihydrodesoxyuridin-6-sulphonat umgewandelt wird. Durch alkalische Desulphonierung wird anschließend das Bisulfit abgespalten und es entsteht Desoxyuridin.

Die Bisulfit-Behandlung der verwendeten DNA-Proben erfolgte mittels EpiTect Bisulfit Kit (*Qiagen*) nach der Anleitung des Herstellers. Hierzu wurde 1 µg der genomischen DNA eingesetzt und mit ddH₂O auf ein Volumen von 20 µl verdünnt. Die verdünnte DNA wurde mit 85 µl Bisulfit-Mix und 35 µl DNA-Protect-Puffer versetzt. Das Gemisch wurde dann im Thermozykler inkubiert. Zunächst erfolgte die Denaturierung bei 99 °C für 5 Minuten, dann eine Inkubation für 25 Minuten bei 60 °C, anschließend erneut die Denaturierung für 5 Minuten bei 99 °C, gefolgt von einer Inkubation von 85 Minuten bei 60 °C und erneuter Denaturierung von 5 Minuten bei 99 °C. Abschließend erfolgte erneut eine Inkubation bei 60 °C für 175 Minuten.

Hiernach wurden die Proben mit 560 µl PB Puffer versetzt und durch Zentrifugation an die EpiTect Spin Säulchen gebunden. Nach zwei Waschschritten mit BW Puffer und Inkubation mit Desulfonierungspuffer (BD) für 15 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von einem weiteren Waschschriff, wurde die Bisulfit behandelte DNA in 20 µl Elutionspuffer (EB) gelöst.

3.2.9 Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels Pyrosequenzierung

Die Analyse der DNA Methylierung nach Bisulfit Behandlung erfolgte unter der Verwendung der Pyrosequenzierungs Technik (Dupont, et al. 2004). Hierfür wurde jeweils 1 µg DNA je Probe mittels EpiTect Bisulfit Kit (*Qiagen*) wie oben beschrieben umgewandelt. Die zu untersuchenden Regionen wurden mittels „nested PCR“ amplifiziert. Hierzu wurden biotinylierte fwd/rev Primer für die innere PCR sowie die AmpliTaq Gold (*Applied Biosystems*) verwendet. Folgende PCR-Bedingungen

wurden verwendet: 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 40 bis 50 Zyklen (95°C für 15 sec, 52-55°C für 45 sec, 72°C für 1 Minute) und ein letzter Extensionsschritt von 72°C für 5 Minuten. Die Einzelstrangaufreinigung der biotinylierten PCR Produkte (25 µl) erfolgte mittels Streptavidin Sepharose™ High Performance Beads unter Verwendung der PyroMark Vakuum Prep Station (*Biotage*). Hierzu wurden zunächst die PCR Produkte mit 68 µl des BW-Puffers und 2 µl der Streptavidin Sepharose Kügelchen versetzt, in eine 96 Lochplatte überführt und für mindestens 20 Minuten auf einem Mikroplattenschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch aus Streptavidin Kügelchen mit gebundenen biotinylierten PCR-Produkten weiter aufgereinigt. Dazu wurden zunächst die Filter des Vakuum Prep Tools mit ddH₂O gespült, anschließend wurde das Gemisch angesaugt und an die Filter gebunden. Es folgten drei Waschschrte mit 70% EtOH, 0,2 M NaOH und 1X Waschpuffer (jeweils für 5 Sekunden). Die aufgereinigten biotinylierten DNA-Einzelstränge wurden anschließend durch Schütteln der Filterspitzen im Annealingpuffer gelöst. Die Einzelstränge wurden anschließend mit jeweils 1 µl des Sequenzierprimers (10 µM) versetzt und für 2 Minuten auf 80°C erhitzt. Die so präparierten Platten wurden anschließend für die Pyrosequenzierung eingesetzt. Die Analyse erfolgte im PSQ96 MA System (*Biotage*) unter Verwendung der Pyro Gold Reagents (*Biotage*). Die Quantifizierung der DNA-Methylierung erfolgte mittels Pyro Q-CpG Software (*Biotage*). Die im Ergebnisteil genannten Methylierungsunterschiede sind immer als Prozentpunkte angegeben.

3.2.10 Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels Sequenzierung

Neben der Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels Pyrosequenzierung erfolgte die Analyse der DNA-Methylierung in den Zelllinien ML5 und ML16 wie in Abbildung 9 beschrieben auch mittels Klonierung und Sequenzierung nach Bisulfitbehandlung. Hierfür wurde die Bisulfit behandelte DNA mittels Bisulfit spezifischer PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3 angegeben. Die verwendeten PCR-Bedingungen waren wie folgt: Initiale Denaturierung (9 min, 94°C), gefolgt von 45 PCR-Zyklen (1 min Denaturierung bei 94°C, 45 sec Primeranlagerung bei 58 bis 62°, 1 min Synthese bei 72°C) sowie einer abschließenden Inkubation (10 min) bei 72°C. Für CpG4 wurde hier ebenfalls eine „nested PCR“ verwendet. Die Quantifizierung erfolgte durch Sequenzierung, hierfür wurden die PCR Produkte

zunächst mittels TOPO TA Cloning Kit nach den Angaben des Herstellers (*Invitrogen*) in den verwendeten pcDNA3.1/V5-His-Topo Vektor kloniert. Die positiven Klone wurden zur Isolation der Plasmide durch Minipräparation mittels QIAprep Miniprep Kit (*Qiagen*) verwendet. Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Zur Sequenzierung wurde das BigDye Terminator Kit V1.1 (*Applied Biosystems*) verwendet, welches bereits die Polymerase, dNTPs, ddNTPs und einen Puffer enthält. Es wurden 300 ng Plasmid sowie 3 µl Reaktionspuffer und 1 µl BigDye-Mix für jede Sequenzierungsreaktion eingesetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Aufreinigung und Sequenzierung der Proben erfolgten durch den Sequenzierservice des *Cologne Center for Genomics* (CCG).

3.2.11 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte, wie schon für die DNA beschrieben, am Photometer (*Nanodrop*) in einem Volumen von 1,5 µl. Für die RNA gilt, dass einer Extinktion von 1,0 bei 260 nm und einer Schichtdicke der Meßküvette von 1 cm eine Konzentration von 40 µg/ml entspricht.

3.2.12 Quantitative *real-time* PCR mit SYBR-Green

Die *real-time* (Echtzeit) PCR ist die Methode der Wahl zur quantitativen Bestimmung der Menge einer bestimmten Sequenz auf DNA- oder RNA-Ebene. Soll die Expression eines oder mehrerer Gene auf RNA-Ebene untersucht werden, so muss die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA kann dann mit Primern, die für das Gen von Interesse spezifisch sind, amplifiziert werden. Die *real-time* PCR hat gegenüber der herkömmlichen PCR den Vorteil, dass während des PCR-Laufs die Menge an PCR-Produkt nach jedem Zyklus bestimmt werden kann. Dies ermöglicht eine genauere Quantifizierung der Menge an Template, als dies durch die Endpunktmessung einer semiquantitativen RT-PCR möglich ist. Hier wurde für die Quantifizierung der Transkriptmenge das QuantiTect SYBR-Green RT-PCR Kit (*Qiagen*) verwendet. Durch den Einsatz dieses Kits können die Reverse-Transkription und die anschließende Amplifikation in ein und demselben Reaktionsgefäß stattfinden. Neben der RNA und den Komponenten des Kits

mussten den Proben nur noch Primer und RNase freies Wasser zugesetzt werden. Die Messungen erfolgten am *real-time* PCR System 7500 (*TaqMan*, *Applied Biosystems*).

Der Farbstoff SYBR-Green bindet unspezifisch an alle doppelsträngige DNA. Daher erfolgte zusätzlich zu den Messungen noch eine Analyse der Schmelztemperatur des erhaltenen PCR-Produkts. Zeigte diese Analyse nur einen Peak, so konnte davon ausgegangen werden, dass die PCR spezifisch für die verwendeten Primer war und das korrekte Produkt gemessen wurde. Zur Quantifizierung der Transkriptmengen wurde zunächst die RNA auf eine Konzentration von 4 ng/μl verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden anschließend 2,5 μl (10 ng RNA) für die *real-time* PCR eingesetzt. Für jede Probe wurde folgender Ansatz verwendet:

RNase freies Wasser	5,3 μl
Quantitect Primer	2,0 μl
2x Quantitect SYBR Green mix	10 μl
RT-PCR Master mix	0,2 μl
RNA	2,5 μl

Die Proben wurden auf eine 96-Loch Reaktionsplatte aufgetragen und die Platte mit einer Klebefolie verschlossen. Durch kurze Zentrifugation der Platte wurden die Proben gemischt und Luftblasen entfernt. Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt:

1. Reverse Transkription	30 min	50 °C	
2. Aktivierungsschritt	15 min	95 °C	
3. PCR Zyklen	15 sec	94 °C	} 40 Zyklen
	30 sec	55 °C	
	35 sec	72 °C	
4. Schmelzkurvenanalyse			

Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte jeweils im 3. Schritt des PCR Zyklus nach der Synthese. Die Analyse der Messdaten erfolgte mit Hilfe der mitgelieferten Software (7500 System Sequence Detection Software V1.2). Es erfolgte eine relative Bestimmung der Transkriptmenge nach der ddCt Methode, die nachfolgend näher erläutert wird. Die Software bestimmt aus den gemessenen Fluoreszenzwerten die Ct-Werte der einzelnen Proben. Der Ct-Wert gibt an, in welchem PCR-Zyklus für eine Probe das Fluoreszenzsignal stärker als das Hintergrundsignal ist. Ist eine bestimmte Sequenz häufiger vorhanden als in einer anderen Probe, so sollte dies zu einem niedrigeren Ct-Wert führen, da bereits früher ein Signal zu detektieren ist. Die von der Software berechneten Ct-Werte wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel weiter verarbeitet. Alle Messungen erfolgten in vier parallelen Ansätzen, so dass die Mittelwerte der Ct-Werte sowie die Standardabweichung der resultierenden Ergebnisse bestimmt werden konnten. Aus den Mittelwerten der Ct-Werte wurden zunächst die dCt-Werte der Proben berechnet. Der dCt Wert ist die Differenz aus dem Ct-Wert des Zielgens und dem Ct-Wert des verwendeten Haushaltsgens einer Probe. Die Differenz aus dem dCt Wert der Kontrolle und dem dCt Wert einer Probe bezeichnet man als ddCt Wert. Dieser Wert gibt Aufschluss darüber, ob sich die Transkription eines Gens in Bezug auf ein Haushaltsgen verglichen mit einer Kontrollprobe verändert hat. Ein positiver ddCt Wert von 1 entspricht einer Verdopplung der Transkription in der entsprechenden Probe, da 1 Zyklus in der PCR einer Verdopplung der DNA-Menge entspricht. Ein ddCt Wert von -1 entspricht einer halbierten Transkriptmenge des Zielgens in der Probe relative zum Haushaltsgen. Als Haushaltsgen wurde für alle quantitativen Analysen das β -Aktin Gen gewählt.

3.2.13 Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA beruht auf der Bewegung geladener Moleküle im elektrischen Feld. Hauptladungsträger der DNA sind die negativ geladenen Phosphatgruppen des alternierenden Zucker-Phosphat-Rückgrades. Die Anzahl der Ladungen ist direkt proportional zum Molekulargewicht des DNA-Fragmentes. Werden Proben mit einem Gemisch von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe auf ein Gel aufgetragen und wird dann eine Spannung angelegt, so wandern kurze Fragmente schneller als große durch die Gelmatrix, da diese wie ein molekulares

Sieb wirkt. Die Wanderungsstrecke der DNA im Gel ist umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA im Gel hängt von der angelegten Spannung, der Gelmatrix sowie vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proben ab. Die Auftrennung der DNA Proben erfolgte hier durch Agarosegelelektrophorese. Die Konzentration der Agarose richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Hier wurden meist Konzentrationen zwischen 1 und 3 % gewählt. Die Agarose wird in 1xTBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgekocht. Der Lösung wird vor dem Gießen des Gels Ethidiumbromid zugesetzt. Das Ethidiumbromid dient der späteren Detektion der DNA-Fragmente. Ethidiumbromid besteht aus einem planaren, aromatischen Ringsystem und interkaliert mit der DNA. Durch Anregung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von etwa 366 nm werden die π -Elektronen des Ringsystems auf ein höheres Energieniveau gebracht. Die Energiedifferenz wird als Fluoreszenzlicht frei, wenn die Elektronen auf ihr Ausgangsniveau zurückfallen. Dieses Fluoreszenzlicht ist sichtbar und somit sind die DNA-Banden detektierbar. Das Agarosegel wurde mit TBE-Puffer überschichtet und die Proben sowie ein Größenmarker aufgetragen.

3.2.14 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) ermöglicht die quantitative Analyse der Bindung bestimmter Proteine an eine ausgewählte Region mit bekannter Sequenz. So können beispielsweise durch die Verwendung von Antikörpern gegen acetylierte Histone solche DNA-Protein Komplexe konzentriert werden in denen die Histone vorwiegend acetyliert vorliegen. Die Analyse der Regionen von Interesse mittels *real-time* PCR und der Vergleich mit Proben bei denen ein Kontrollantikörper verwendet wurde zeigen dann, ob an dieser Region die entsprechenden Proteine binden. In diesem Fall sollte untersucht werden ob das MeCP2-Protein an die untersuchten Sequenzen im *SMN*-Promotorbereich bindet. Zur Analyse der im Chromatin mit MeCP2-Protein assoziierten Sequenzen wurde das LowCell# ChIP Kit (*Diagenode*) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Für die Experimente wurden pro Versuchsansatz jeweils $3 \cdot 10^5$ Fibroblastenzellen der Zelllinie ML17 eingesetzt. Die Zellen wurden nach Behandlung bzw. Transfektion und angegebener Inkubationszeit durch Trypsinisierung geerntet. Anschließend erfolgte die Vernetzung von DNA assoziierten Proteinen mit der DNA durch die Zugabe von Formaldehyd. Hierzu

wurden die trypsinisierten Fibroblasten durch Zentrifugation pelletiert und in einem Volumen von 500 µl NaBu-PBS resuspendiert. Die Vernetzung erfolgte durch die Zugabe von 13,5 µl 36,5% Formaldehyd (Endkonzentration 1%). Die Fixierreaktion wurde durch die Zugabe von 57 µl 1,25 M Glycin zu einer Endkonzentration von 0,125 M und anschließende Inkubation bei Raumtemperatur gestoppt. Das so gewonnene Chromatin wurde durch Scheren im Ultraschallsonikator (*Diagenode*) bei maximaler Energie für 15 Minuten mit 30 sec An/Aus Zyklen fragmentiert. Für die Chromatin-Immunopräzipitation wurden für jede Reaktion 5 µg des MeCP2 Antikörpers mit 10 µl der mit Protein A beschichteten magnetischen Kügelchen aus dem Kit versetzt und zur Bindung 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden für jede IP Reaktion 100 µl des präparierten Chromatins zu dem an die magnetischen Protein A Kügelchen gebundenen Antikörper gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Aufreinigung des präzipitierten Proteins erfolgte mittels eines magnetischen Ständers. Die DNA wurde durch Zugabe des DNA Aufreinigungsreagenz und Inkubation in kochendem Wasser für 10 Minuten von den Proteinanteilen getrennt. Anschließend wurden die Proteine durch einen Proteinase K Verdau (30 Minuten bei 55°C im Thermomixer bei 1000 U/min) abgebaut. Danach wurden die Proben erneut für 10 min. in kochendem Wasser inkubiert, um die DNA zu eluieren. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und anschließend die obere Phase mit der DNA abgenommen. Die DNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop durch eine *real-time* PCR, wie beschrieben, untersucht. Hier wurden allerdings der Power SYBR Green Master Mix sowie die in Tabelle 3 angegebenen Primer verwendet. Alle PCR Reaktionen wurden mindestens in Triplikaten durchgeführt.

3.2.15 Methyltransferaseaktivitätstest

Zur Bestimmung der Methyltransferaseaktivität in Kernextrakten wurde das EpiQuik™ DNA Methyltransferase Activity/Inhibition Assay Kit (*Epigentek*) verwendet. Zunächst wurden Kernextrakte mittels EpiQuik™ Nuclear Extraction Kit I nach der Anleitung des Herstellers gewonnen. Hierfür wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen ausplattiert und nach 48h Inkubation trypsinisiert und in 100 µl Puffer NE1 (1X) resuspendiert. Durch Zentrifugation bei 14.000 U/min wurden anschließend die zytoplasmatischen Extrakte abgetrennt und das Pellet mit den

Bestandteilen des Zellkerns weiterverwendet. Diese Kernpellets wurden in Puffer NE2 durch vortexen und Inkubation bei 4°C für 15 Minuten resuspendiert und aufgeschlossen. Anschließend wurde der Proteinanteil (Kernextrakte) durch Zentrifugation bei 14.000 U/min von den übrigen Bestandteilen des Zellkerns getrennt. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt (siehe unten) und gleiche Proteinkonzentrationen (2 µg/µl) für die weiter Analyse eingesetzt. In 96 well Mikrotiterplatten wurden jeweils 3 µl der Kernextrakte mit den Lösungen M2 und M3 versetzt. Nach Inkubation bei 37°C für 90 Minuten wurden die Wells zunächst gewaschen und dann mit 50 µl der Lösung M5 versetzt. Nach 60 minütiger Inkubation auf dem Horizontalschüttler wurden die Vertiefungen erneut gewaschen und mit 50 µl der Lösung M6 versetzt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen erneut gewaschen und mit 100 µl der Entwicklerlösung (M7) versetzt. Die Enzymreaktion wurde nach 10 Minuten durch die Zugabe der Lösung M8 abgestoppt und die Methyltransferaseaktivität durch die kolorimetrische Messung bei 450 nm im Mikroplattenlesegerät (*Tecan*) gemessen.

3.2.16 Transfektion eukaryotischer Zellen

3.2.16.1 Transfektion durch Elektroporation

Für die transiente Transfektion der Fibroblasten-Zelllinie ML17 wurde die Technik der Elektroporation verwendet. Hierfür wurde das Basic Nucleofector Kit für primäre Fibroblasten sowie der Nukleofektor der Firma Amaxa verwendet. Für die Transfektion wurden pro Ansatz $5 \cdot 10^5$ Zellen einer niedrigen Passage der Zelllinie durch Zentrifugation pelletiert und in 100 µl Basic Nucleofector Suspension gelöst. Die Zellsuspension wurde jeweils mit je 4 µg eines Konstrukts mit der Fireflyluziferase und 100 ng eines Konstrukts mit der Renillaluziferase versetzt. Die Suspension wurde in die Küvetten überführt und zur Elektroporation wurde das Programm V13 des Nukleofektors verwendet. Anschließend wurden die Proben mit 500 µl des vorgewärmten Zellkulturmediums versetzt und in die Vertiefung einer 6-Loch Zellkulturplatte übertragen. Das Kulturvolumen wurde mit frischem Zellkulturmedium auf 2 ml aufgefüllt. Danach wurden die Zellen für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Nach diesem Zeitraum wurde die Promotoraktivität der Konstrukte mittels Luziferaseassay bestimmt.

3.2.16.2 Lipophile Transfektion mit Fugene HD

Die Transfektion der Zelllinie HEK293T erfolgte mittels lipophiler Transfektion. Hierfür wurden am Tag vor der Transfektion je $1 \cdot 10^5$ Zellen in die Löcher einer 12-Lochplatte ausgesät. Nach 24h wurden 50 μ l OptiMEM mit 2,5 μ g der Fireflyluziferase-konstrukte und 200 ng des Renilla-Luziferasekonstrukts gemischt. Anschließend wurden 7,5 μ l des FugeneHD Transfektionsreagenz zugegeben. Das Gemisch wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert um die Bildung von Komplexen der DNA mit dem lipophilen Transfektionsreagenz zu ermöglichen. Anschließend wurde das Kulturmedium der Zellen erneuert und der Transfektionsansatz langsam tropfenweise hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend wieder für die angegebenen Zeiträume im Inkubator aufbewahrt. Nach diesem Zeitraum wurde die Promotoraktivität der Konstrukte mittels Luziferaseassay bestimmt.

3.2.17 Luziferaseassay

Die Analyse der Promotoraktivität der transfizierten Konstrukte erfolgte mittels Aktivitätstest für die Reportergenprodukte (Renilla- und Fireflyluziferase). Hierzu wurde das *Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit* von *Promega* verwendet, welches die Quantifizierung der Aktivität beider Enzyme in einem Reaktionsansatz ermöglicht. Hierfür wurden zunächst die zuvor mit den unterschiedlichen Konstrukten transfizierten Zellen mittels Passiv Lysis Puffer aus dem Reporter Assay Kit lysiert. Die Zelllysate wurden anschließend aliquotiert und mindestens Triplikate von jeweils 20 μ l für die Messung in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen vorgelegt. Die Messung erfolgte im GloMax[®] 96 Microplate Luminometer (*Promega*) mit zwei Injektoren. Der erste Injektor wurde mit dem Puffer für die Aktivitätsmessung der Fireflyluziferase (LAR2) befüllt. Der zweite Injektor hingegen mit dem Stop&Glow Puffer welcher die Aktivität der Fireflyluziferase abstoppt und die Messung der Renilla Luziferase ermöglicht. Es wurden automatisch 50 μ l der Puffer nacheinander durch die Injektoren zugegeben und jeweils die Aktivität der Luziferasen (Lichtreaktion) gemessen. Zur Bestimmung der relativen Aktivität der Konstrukte mit der Fireflyluziferase wurden jeweils die Messergebnisse dieses Konstrukts mit den Messwerten für die Renillaluziferase normalisiert, um eventuelle Schwankungen in der Zellzahl und der Transfektionseffizienz zu berücksichtigen. Die Ergebnisse

wurden jeweils auf das promotorlose Kontrollkonstrukt (pGL4 Firefly-Luziferase Vektor) bezogen.

3.2.18 Transfektion mit siRNAs

Die Transfektion der Fibroblasten-Zelllinie ML17 mit siRNAs erfolgte durch Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz Dharmafect Transfection Reagent1 (*Thermo Fisher*). Hierfür wurden am Tag vor der Transfektion in jeder Vertiefung einer 6-Loch Zellkulturplatte $1 \cdot 10^5$ Zellen in Zellkulturmedium ohne Antibiotika ausplattiert. Für die Transfektion wurden 100 μ l der siRNAs mit einer Konzentration von 1 μ M mit 394 μ l Optimem und 6 μ l Transfektionsreagenz versetzt. Die Ansätze wurden jeweils 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung der für Transfektion notwendigen Komplexe aus siRNA und Transfektionsreagenz zu ermöglichen. Anschließend wurden den Ansätzen 1,6 ml Zellkulturmedium ohne Antibiotika zugegeben und die Ansätze auf die Zellen in den 6-Loch Zellkulturplatten gegeben. Hiernach wurden die Zellen für die angegebenen Zeiträume im Inkubator aufbewahrt. Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurden Zellen mit der *siCONTROL Tox Transfection control* transfiziert. So behandelte Zellen sollen nach 48h bei erfolgreicher Transfektion vollständig abgestorben sein.

3.2.19 EMSA

Zur Untersuchung von DNA-Protein Interaktionen in der Promotorregion der *SMN*-Genkopien wurde die EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) Technik angewendet. Hierbei wird ausgenutzt, dass sich das Laufverhalten von markierter DNA in einer nativen Polyacrylamid-Elektrophorese durch die Bindung von Proteinen verändert. Eine Veränderung des Laufverhaltens der DNA stellt also den Nachweis für die Bindung eines oder mehrerer Proteine da. Für diese Experimente wurde das LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (*Thermo Fisher*) verwendet, welches eine nichtradioaktive Markierung der DNA ermöglicht. Für die Experimente wurden zwei 60 Nukleotide lange komplementäre Oligonukleotidmoleküle verwendet, die am 5' Ende durch Biotin markiert sind. Die Oligonukleotide decken die Sequenz von Position -267 bis -326 relativ zum ATG der *SMN*-Genkopien ab und enthalten die CpG-Dinukleotide an Position -290 und -296.

Die beiden Oligonukleotidmoleküle wurden zunächst im Verhältnis 1:1 gemischt, durch Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend durch langsames Abkühlen (1°C pro Minute) vollständig miteinander verbunden. Nach *in vitro* Methylierung des Doppelstrangs mittels M.Sss1 CpG-Methylase, wurde der Doppelstrang mit ddH₂O auf die gewünschte Endkonzentration (50 fmol/μl) für die EMSA-Experimente verdünnt.

Die Reaktionsansätze für die Bindungsreaktion enthielten neben den markierten DNA Doppelsträngen noch folgende Komponenten des Kits:

Tabelle 11: Verwendete Komponenten für die EMSA Bindereaktion

Komponente	Kontrolle	+ HeLa Extrakte	+ Hela Extrakte + Kompetitor
10X Reaktionspuffer	1 μl	1 μl	1 μl
Poly dI/dC 1μg/μl	1 μl	1 μl	1 μl
MgCl ₂ 100 mM	1 μl	1 μl	1 μl
Glycerol 50%	1 μl	1 μl	1 μl
Biotin markierte DNA	2 μl	2 μl	2 μl
HeLa Kern Extrakte 7,4 μg/μl	---	4 μl	4 μl
unmarkierte DNA (100X)	---	---	2 μl
(Antikörper)		Evtl. 3 μg	
H ₂ O	auf 20 μl	auf 20 μl	auf 20 μl

Die Reaktionsansätze wurden für 30 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend mit 5 μl Ladepuffer versetzt. Anschließend wurden 20 μl der Proben auf ein 6 prozentiges natives Polyacrylamidgel aufgetragen und bei einer Spannung von 180V in 1% TBE-Puffer für etwa 3 Stunden aufgetrennt. Danach wurden die Proben mittels „Wet-Blot“ in 1% TBE Puffer auf eine Nylonmembran übertragen. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (120 mJ/cm²) wurden die DNA-Proteinkomplexe mit der Membran irreversibel vernetzt. Der Nachweis der markierten DNA auf der Membran erfolgte durch immunologische Detektion der Biotin-Reste. Hierzu wurde die Membran zunächst für 15 Minuten in 30 ml Blockierpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran für weitere 15 Minuten in 30 ml des mit 67 μl der Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase Lösung versetzten Blockierpuffers inkubiert. Nach 5 Waschschr

1X Waschpuffer und Inkubation mit Equilibrierungspuffer erfolgte der Nachweis der DNA-Proteinkomplexe mittels Chemilumineszenz. Hierzu wurde die Membran für 5 Minuten in Chemilumineszenzlösung inkubiert und anschließend das Bandenmuster mittels Röntgenfilm dokumentiert.

3.2.20 *In vitro* Methylierung von DNA

Um den Einfluss der DNA-Methylierung des *SMN*-Promotors auf dessen Expression und die Bindung von Proteinen näher zu untersuchen, wurden die entsprechenden Konstrukte *in vitro* methyliert. Hierzu wurde die CpG-Methyltransferase M.SssI (*NEB*) verwendet. Dieses Enzym überträgt Methylgruppen vom Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin (SAM) auf die beiden Cytosinreste eines CG-Dinukleotides im DNA-Doppelstrang und führt so zur Methylierung aller Cytosinreste in CG-Dinukleotiden eines DNA-Doppelstrangs. Zur vollständigen Methylierung der Sequenzen wurden die DNA-Proben in 1X NEB-Puffer 2 mit der DNA-Methyltransferase und dem Methylgruppendonor SAM (Endkonzentration 160 μ M) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Um eine teilweise Methylierung der Promotoregion für die Luziferaseassays zu erreichen, wurde die Inkubationszeit verkürzt.

3.2.21 Überprüfung der DNA-Methylierung mittels BstUI Verdau

Um zu überprüfen, ob die für die EMSA Versuche eingesetzten Fragmente nach *in vitro* Methylierung mit der M.SssI Methyltransferase vollständig methyliert vorlagen, wurden die entsprechenden Fragmente einem Verdau mit dem methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym BstUI unterworfen. Dieses Enzym schneidet die Sequenz 5'-GCGC-3' nur dann, wenn die Cytosinreste in dieser Sequenz unmethyliert vorliegen. Zur Analyse wurde 1 μ g der *in vitro* methylierten DNA Probe für 1 Stunde mit 10 Einheiten Enzyme in 1X Reaktionspuffer bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem Kontrollverdau von 1 μ g der unmethylierten DNA-Probe verglichen. Eine vollständige Methylierung sollte keine weiteren Banden außer der ursprünglichen Bande zeigen, während in der Kontrollreaktion mit der unmethylierten Probe ein vollständiger Verdau der DNA-Probe erfolgen sollte.

3.2.22 Klonierung des *SMN*-Minimalpromotors nach Restriktionsverdau

Um den *SMN*-Minimalpromotor von Position -476 bis -13 relativ zum ATG in den Luziferaseexpressionsvektor pGL4 zu klonieren, wurde das zu klonierende Amplifikat mit den in Tabelle 5 angegebenen Primern amplifiziert. Der Fwd-Primer enthält eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym HindIII, während der Rev-Primer die Erkennungssequenz für BmtI trägt. Das PCR wurde nach der Amplifikation mit diesen beiden Restriktionsenzymen geschnitten, ebenso der pGL4 Vektor, der in der *multiple cloning site* vor dem Luziferasegen ebenfalls Schnittstellen für diese beiden Restriktionsenzyme trägt. Das so behandelte PCR-Produkt und der linearisierte Vektor wurden anschließend mittels QIAEXII Gel Extraction Kit (*Qiagen*) aufgereinigt. Die aufgereinigten Fragmente wurden dann durch die T4 DNA Ligase miteinander ligiert. Die Transformation des ligierten Vektors erfolgte anschließend durch Hitzeschock von chemokompetenten Top10 Zellen (*Invitrogen*).

3.2.22.1 Klonierung des *SMN*-Minimal Promotors nach Methylierung

Um bei der Untersuchung der Promotoraktivität auszuschließen, dass die Methylierung des Vektors die Expression der Luziferase beeinflusst, wurde der *SMN*-MinimalPromotor vor der Klonierung mittels M.SssI Methyltransferase *in vitro* methyliert.

3.2.23 Proteinanalyse

3.2.23.1 Isolation von Proteinen aus Fibroblasten

Zur Isolation von Proteinen aus Fibroblasten wurden die Zellen auf den Gewebekulturplatten zunächst zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Das PBS wurde sorgfältig entfernt und die Zellen wurden mit 50 µl Ripa-Puffer versetzt. Die Platten wurden zur Lyse der Zellen für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit einem Zellschaber eingeeengt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße wurden für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in der vorgekühlten Zentrifuge für 20 Minuten bei 4°C und 13.200 U/min zentrifugiert. Durch diesen Schritt wurden die Proteine von Nukleinsäure- und Membranresten getrennt. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues

Reaktionsgefäß überführt und sofort für eine Western-Blot Analyse verwendet oder bei -80 °C gelagert.

3.2.23.2 Isolation von Proteinen aus Gewebe

Zur Isolation von Proteinen aus Hirnschnitten (siehe Abschnitt 3.2.1) wurden diese im Reaktionsgefäß je nach Menge mit 50-100 µl Ripa-Puffer versetzt. Durch Auf- und Abpipettieren wurde das Gewebe homogenisiert. Der Ansatz wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert, die weiteren Schritte erfolgten wie oben für die Proteine aus Fibroblasten beschrieben.

3.2.23.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes von Zelllysaten aus Fibroblasten bzw. Gewebeproben (Hirnschnitte) erfolgte mittels Proteinkonzentrationsbestimmung nach *Bradford*. Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der photometrischen Messung einer Farbreaktion. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue bildet in saurer Lösung sowohl mit den kationischen als auch mit den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. Durch diese Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm auf 595 nm. Durch Messung der Absorption der mit Proteinlösung versetzten Bradfordlösung bei 595 nm gegen Bradfordlösung ohne Proteinzusatz im Photometer kann die Proteinkonzentration durch den Vergleich mit einer Eichkurve bestimmt werden. Zum Erstellen der Eichkurve wurden fünf unterschiedlich konzentrierte BSA-Stammlösungen gemessen. Es wurden jeweils 0,25, 0,5, 1, 2, und 5 µg BSA zu 500 µl Bradford-Lösung gegeben. Es erfolgten Dreifachmessungen und die Standardkurve wurde im Photometer gespeichert. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils 500 µl Bradford-Reagenz mit 2 µl Proteinlösung versetzt. Die Proben wurden gevortext und nach 10-15 Minuten die Extinktion bei 595 nm im Vergleich zu Leerwert (500 µl Bradfordlösung) am Spektrophotometer bestimmt. Die Extinktion wurde zweimal bestimmt und das Photometer errechnete automatisch die Proteinkonzentration in µg /2 µl Proteinlösung.

3.2.23.4 SDS-PAGE

Die Abkürzung SDS-PAGE steht für Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Es handelt sich dabei um eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Bei Proteinen ist im Gegensatz zu Nukleinsäuren die negative Ladung nicht proportional zum Molekulargewicht. Die Ladung variiert in Abhängigkeit von der Anzahl an Aminosäuren mit positiven und negativen Seitenketten und wird durch den pH-Wert beeinflusst. Daher werden die Proteine mit dem ionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) versetzt, wodurch die Proteine denaturiert werden und eine zu ihrem Molekulargewicht proportionale negative Ladung erhalten. Die Eigenladung und die dreidimensionale Struktur der Proteine spielt dadurch eine nur untergeordnete Rolle für die elektrophoretische Auftrennung. Alle Proteine wandern im elektrischen Feld nahezu unabhängig von ihrer Eigenladung.

Bei der SDS-PAGE wird ein diskontinuierliches Gelsystem mit Sammelgel und Trenngel verwendet. Das 5%ige Sammelgel dient zur Fokussierung der Proteine des Proteingemischs in einer Bande. Der niedrige Vernetzungsgrad im Sammelgel lässt alle Proteine im elektrischen Feld gleich schnell laufen. Der pH von 6,8 im Sammelgel führt dazu, dass Glycin aus dem Elektrophoresepuffer im Sammelgel ungeladen vorliegt und nicht im elektrischen Feld wandert. Die Proteinfront bewegt sich zwischen dem Glycin und den negativ geladenen Chloridionen, bis sie die Grenze zum Trenngel erreicht hat. Im stärker vernetzten (hier 12%igen) Trenngel mit einem pH von 8,8 nimmt das Glycin eine negative Ladung an und wandert nun im elektrischen Feld. Die Glycinionen wandern schneller als die größeren Proteine und der Sammeleffekt ist aufgehoben. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist wie schon bei der elektrophoretischen Auftrennung der Nukleinsäuren umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes.

Für die Proteinanalyse wurde das *Mini Trans-Blot Cell System* von *BioRad* verwendet. Das 12%ige Trenngel wurde mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet. Das fertige Gel wurde anschließend in die Elektrophoresekommer überführt und diese mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt. Von den Proteinproben wurden 7,5 µg Protein mit 5 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Durch Inkubation bei 95°C für 5 Minuten durch und das β-Mercaptoethanol im Probenpuffer wurden die Proteine anschließend vollständig denaturiert.

Die Proben wurden dann in die Taschen des Polyacrylamidgels aufgetragen. Als Größenmarker diente der Precision Plus Protein Standard (*BioRad*). Daraufhin wurde an das Gel eine Spannung von 50V angelegt. Nachdem die Lauffront der Probe die Grenze zum Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 80 bis 100V erhöht und das Gel für etwa 3 Stunden laufen gelassen bis schließlich der Blaumarker das Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen und das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinen auf die passende Größe für den Western-Blot zurechtgeschnitten.

3.2.23.5 Western-Blot

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, auf der sie sich leichter immunologisch nachweisen lassen. Da die Proteinmenge im Folgenden genau quantifiziert werden sollte, war ein vollständiges Übertragen der Proteine besonders wichtig. Daher wurde der so genannte „Wet-Blot“ verwendet, um die Proteine vollständig auf die Membran zu übertragen. Das Trenngel wurde in einer Schale mit Transferpuffer auf ein Filterpapier gelegt, darauf luftblasenfrei die Nitrozellulosemembran und schließlich wieder ein Filterpapier. Der Stapel wurde zwischen die beiden Schaumstoffkissen gelegt und mit einer Halterung zusammengepresst. Die Halterung wurde in die Blotting-Kammer überführt und so fixiert, dass die Nitrozellulosemembran der Anode zugewandt ist. Dann wurde die Blotting-Kammer mit Transfer-Puffer vollständig gefüllt und eine Spannung von 30V angelegt. Der Aufbau wurde mit einem Kühlakku versetzt und über Nacht bei 4°C im Kühlraum belassen, um die Degradierung von Proteinen zu verhindern. Ein Magnetrührer sorgte für eine ständige Durchmischung des Transferpuffers. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde durch eine Ponceau-Färbung überprüft. Hierzu wurde die Membran kurz in Ponceau-Färbelösung gelegt. Der rote Farbstoff färbte die Proteine auf der Membran reversibel an und wurde anschließend durch einen Waschschrift mit TBS-Tween wieder entfernt.

3.2.23.6 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Der immunologische Nachweis der Proteine auf der Membran erfolgte mit Hilfe von Antikörpern. Der erste (primäre) Antikörper bindet spezifisch an das Zielprotein, während ein zweiter (sekundärer) Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, spezifisch an primäre Antikörper einer Art bindet. Die Bindung des sekundären Antikörpers kann dann mittels Autoradiographie nachgewiesen werden. Damit der primäre Antikörper nur spezifisch an das Zielprotein bindet, wurde die Membran mit den Proteinen zunächst für 3 Stunden in einer Blockierlösung aus 6% Milchpulver in TBS-Tween auf dem Schüttler inkubiert. Dieser Schritt reduziert die Hintergrundsignale, welche durch die unspezifische Bindung des primären oder sekundären Antikörpers an die Membran entstehen könnten. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit 10 ml der in 2% Milchpulver/TBS-Tween verdünnten primären Antikörpers inkubiert. Die primären Antikörper wurden je nach Expression des Proteins verdünnt (zwischen 1:1000 und 1:40000) und auf die Membran in eine 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Membran mit dem Antikörper wurde für eine Stunde unter Schütteln bei 4°C inkubiert, um eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers zu gewährleisten. Anschließend wurde die Membran fünfmal für 5 Minuten mit TBS-Tween gewaschen, um ungebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen.

Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in 2% Milchpulver/TBS-Tween gegeben und die Membran für eine Stunde mit dem Antikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut fünfmal für 5 Minuten gewaschen und danach mit der Chemilumineszenzlösung versetzt. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase (*Horse Radish Peroxidase*) ist in der Lage, das in der Chemilumineszenz-Lösung enthaltene Luminol durch Spaltung von Wasserstoffperoxid zur Fluoreszenz anzuregen. Dieses Fluoreszenzsignal reicht aus, um sensitive Fotofilme zu belichten. Zum Entwickeln der Filme wurde die überschüssige Chemilumineszenz abgegossen und die Membran in eine Fotobox unter eine eingeklebte Folie gelegt. In der Dunkelkammer wurden dann die sehr lichtempfindlichen Filme aufgelegt und für 1 Sekunde bis zu 5 Minuten belichtet. Die belichteten Filme wurden anschließend sofort in die Entwicklermaschine eingeführt, wo Entwicklung und Fixierung der Filme automatisch erfolgten. Der fertig entwickelte Film zeigt an den Stellen, an denen auf der Membran der sekundäre Antikörper

gebunden hatte, dunkle Banden auf. Anschließend wurde noch der Protein-Standard zur besseren Orientierung auf dem Film nachgezeichnet.

Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit dem digitalen Geldokumentations-System (ChemiDoc XRS) der Firma *BioRad*. Hierbei wurden die Filme auf einen Durchlichttisch gelegt und mit einer Digitalkamera fotografiert. Die weitere Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Quantifizierungssoftware (Quantity One V1.2, *BioRad*) und des Tabellenkalkulationsprogramms Excel. Um die Menge des Zielproteins zu quantifizieren, muss diese mit der Transkription eines Haushaltsgens, welches normalerweise keine Veränderung in seiner Expression aufweist, verglichen werden. Hierzu wurde das β -Tubulin als Haushaltsgen gewählt. In der Auswertung wurden jeweils die Verhältnisse der Menge an β -Tubulin zur Menge des SMN-Proteins von verschiedenen Proben miteinander verglichen.

3.2.24 Datenauswertung

Für die Untersuchung der Transkriptmengen durch die *real-time*-PCR wurden jeweils vier RNA-Proben des gleichen Versuchs parallel analysiert. Auch hier wurde der Mittelwert der Messungen berechnet und der Standardfehler des Mittelwertes bestimmt. Die statistische Überprüfung der Ergebnisse erfolgte mittels Student's T-Test (Excel). Bei statistisch signifikanten Ergebnissen wurden die p-Werte folgendermaßen klassifiziert: (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$) und in den Diagrammen in Form von Sternen angegeben.

4 Eigene Vorarbeiten

Im Rahmen meiner Diplomarbeit habe ich untersucht, ob die Expression des *SMN2*-Gens durch Methylierung reguliert wird. Hierfür habe ich zunächst die Promotorregion der *SMN*-Genkopien 3000 bp stromaufwärts und stromabwärts vom ATG *in silico* untersucht (die Promotorregion von *SMN1* und *SMN2* sind wie in 2.10 beschrieben identisch). Die Analyse zeigte, dass die Promotorregion der *SMN*-Gene vier CpG reiche Sequenzen (CpG Inseln) enthält (Abbildung 7), die nachfolgend als *SMN*CGI 1, *SMN*CGI 2, *SMN*CGI 3 und *SMN*CGI 4 bezeichnet werden. *SMN*CGI 1 ist 252 bp lang (GC Gehalt: 54,8%), enthält 14 CpG-Dinukleotide und erstreckt sich von Position -896 bis -645 relativ zum ATG der *SMN*-Gene. *SMN*CGI 2 enthält 12 CpG-Dinukleotide, hat eine Länge von 223 bp und einen GC-Gehalt von 58,3%, es reicht von Position -469 bis -247. Dieses CGI enthält den ersten der drei Transkriptionsstartpunkte der *SMN*-Genkopien. *SMN*CGI 3 ist mit 446 bp die größte der vier CpG reichen Regionen, enthält 38 CpG-Dinukleotide und erstreckt sich von Position -151 bis +295 (GC-Gehalt: 62,1%). Das *SMN*CGI 4 ist mit 303 bp (von Position +844 bis +1146) kürzer, zeigt einen niedrigeren GC-Gehalt (59,4%) als *SMN*CGI 3 und enthält 21 CpG-Dinukleotide. *SMN*CGI 3 weist eine hohe CpG-Dinukleotid Dichte (Verhältnis von erwarteten und gefundenen CpG-Dinukleotiden in einer CpG-Insel) auf (0,94) und kann nach der Klassifizierung von Weber et al. (Weber, et al. 2007) als starke CpG-Insel bezeichnet werden, welche üblicherweise unmethyliert vorliegt. *SMN*CGI 1, 2 und 4 sind CpG-Inseln mit mittlerer CpG-Dinukleotiddichte (*SMN*CGI1: 0,74 *SMN*CGI2: 0,79 *SMN*CGI4: 0,79) welche meist vollständig methyliert sind. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Expression des *SMN2*-Gens möglicherweise durch die Methylierung in diesen CpG-reichen Sequenzen beeinflusst wird.

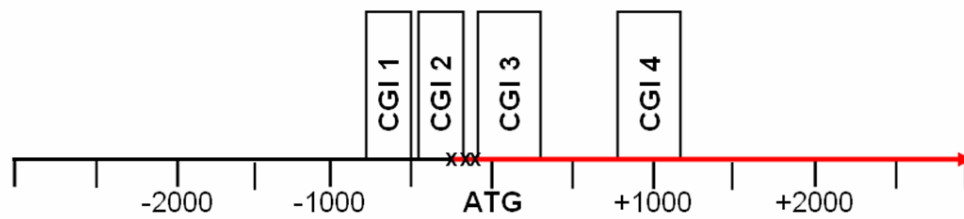


Abbildung 7: Die *SMN*-Genkopien beinhalten 4 mögliche CpG-Inseln (CGI). Schematische Übersicht der Lage und Größe der mittels *CpG search* (www.ebi.ac.uk/emboss) identifizierten CpG-Inseln innerhalb des *SMN* Promotorbereichs (^{*SMN*}CGI 1, ^{*SMN*}CGI 2, ^{*SMN*}CGI 3 und 4 ^{*SMN*}CGI). Dargestellt ist die Region 3000 bp stromaufwärts und -abwärts des Translationsstartpunkts (ATG). Die Lage der drei beschriebenen Transkriptionsstartpunkte der *SMN*-Genkopien innerhalb der 5' untranslatierten Region sind durch Kreuze dargestellt.

Durch Expressionsanalysen in den SMA-Fibroblastenzelllinien ML5 und ML16, die eine Deletion des *SMN1*-Gens aufweisen und jeweils 3 *SMN2*-Genkopien tragen, konnte die Induktion der *SMN2*-Transkription und Translation durch den DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin nachgewiesen werden (Abbildung 8). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass zumindest einige Desoxycytidine im untersuchten Abschnitt des *SMN2*-Gens methyliert vorliegen und dass diese Methylierung die Expression des *SMN2*-Gens vermindert. Durch Analyse der Methylierung mittels genomischer Sequenzierung in Proben der oben genannten Zelllinien nach der Bisulfitmethode konnte ich zeigen, dass die Promotorregion teilweise methyliert ist. Die Analyse von insgesamt mehr als 100 sequenzierten Klonen zeigte ein konserviertes Methylierungsprofil des *SMN2*-Gens. Die weiteren Analysen zeigten, dass diese Modifikation durch die Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin teilweise entfernt werden kann und vermutlich an der epigenetischen Regulation der Transkription dieses Gens beteiligt ist (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

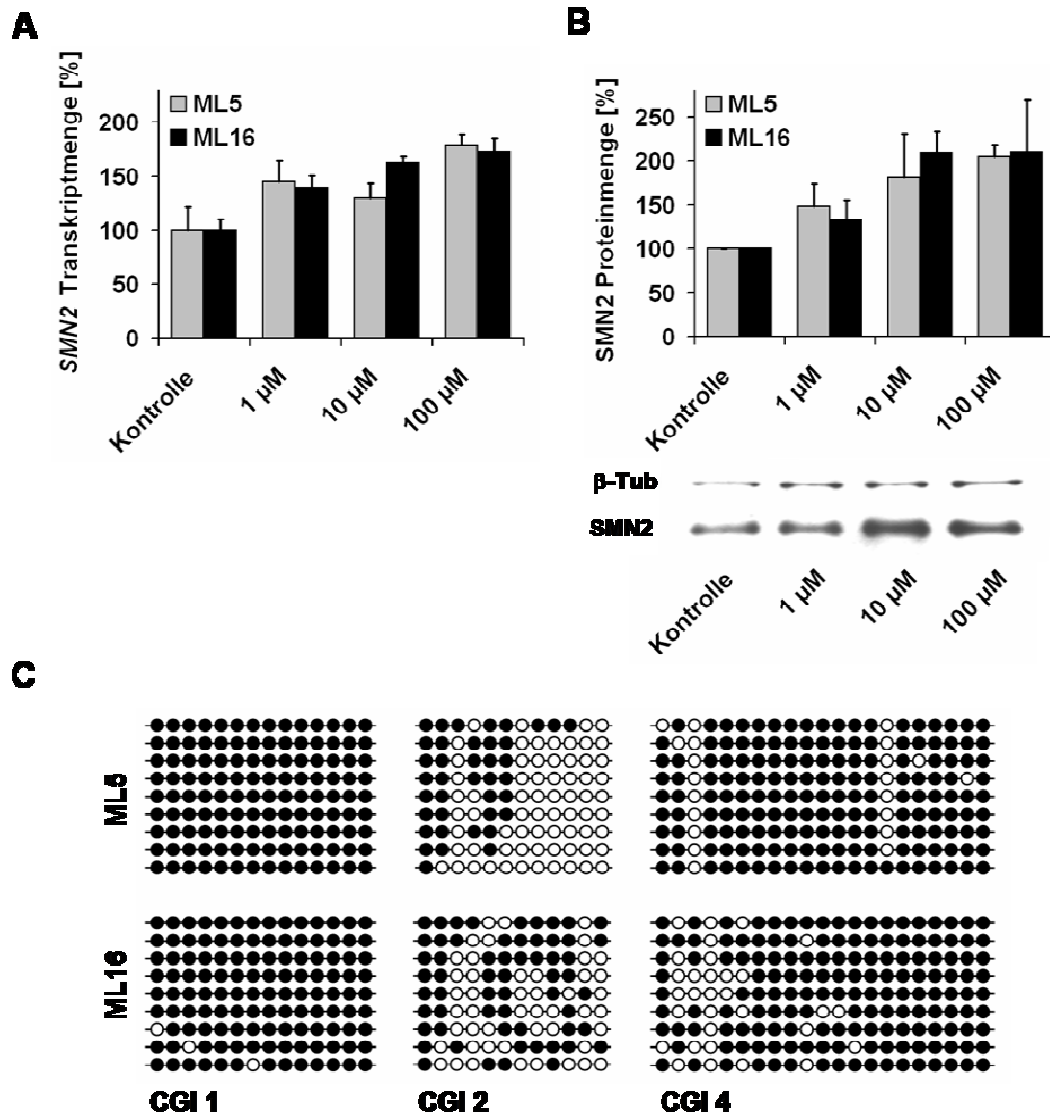


Abbildung 8: (A,B) Aktivierung der Transkription und Translation des *SMN2*-Gens durch den DNA-Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza) und exemplarischer Western-Blot nach Behandlung mit 5-Aza. (C) Schematische Darstellung der Ergebnisse der genomischen Sequenzierung nach Bisulfitbehandlung der SMA-Fibroblastenzelllinien ML5 und ML16. Die gefüllten Kreise symbolisieren methylierte Cytosinreste, während die ungefüllten Kreise für nichtmethylierte Cytosinreste stehen.

5 Ergebnisse

5.1 Promotoraktivitätstests

Um zu untersuchen, ob die Promotoraktivität der *SMN*-Genkopien tatsächlich durch DNA-Methylierung reguliert wird und mit dieser korreliert, wurden Promotoraktivitätstests durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die identische minimale Promotorregion der beiden *SMN*-Genkopien von Position -13 bis -456 relativ zum ATG mittels PCR amplifiziert und in den pGL4 Luziferasevektor kloniert. Der erhaltene pGL4 Luziferasevektor mit der minimalen *SMN*-Promotorregion wurde anschließend mittels CpG Methyltransferase *in vitro* methyliert. Dabei wurde die Behandlungsdauer variiert, um unterschiedliche Methylierungsgrade zu erreichen. Die Behandlung mit dem Enzym führt bei den verwendeten Konditionen zu einer teilweisen Methylierung der Vektoren, durch die Behandlung für 60 Minuten soll eine vollständige Methylierung aller CpG-Dinukleotide erreicht werden. Dies wurde durch Restriktionsverdau mit der methylierungssensitiven Endonuklease BstUI exemplarisch an der im Promotor vorhandenen Schnittstelle für dieses Enzym überprüft. Abbildung 9 zeigt den Restriktionsverdau für das PCR-Produkt des *SMN*-Minimalpromotors (SMNPR). Dieses wurde für 60 Minuten mit 1U/μg DNA der M.SssI Methyltransferase behandelt. Anschließend wurde das *in vitro* methylierte PCR-Produkt SMNPR_{met} einem Verdau mit 10 U/μg DNA BstUI unterzogen. Der Vergleich mit dem unmethylierten PCR-Produkt zeigt, dass dieses durch das Restriktionsenzym vollständig abgebaut wurde, während die mit der M.SssI Methyltransferase behandelte Probe durch die Methylierung vollständig vor Abbau geschützt ist (Abbildung 9).

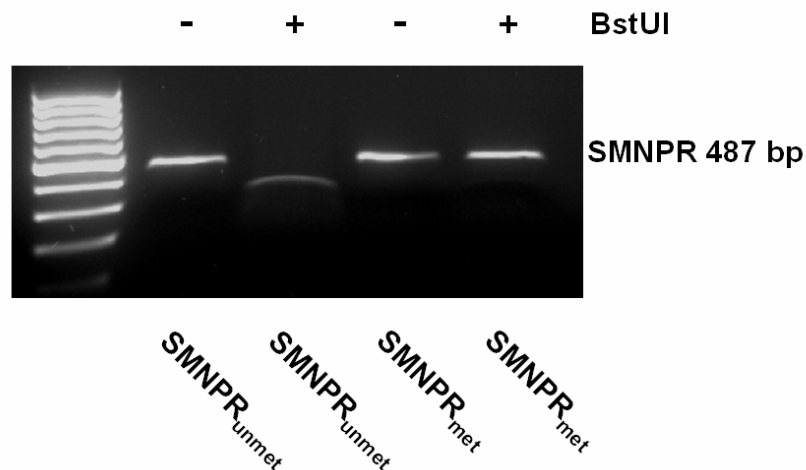


Abbildung 9: Überprüfung der Methylierung des *SMN*-Promotors durch BstU1 Verdau. Das nicht methylierte PCR-Produkt ($\text{SMNPR}_{\text{unmet}}$) wird durch die Behandlung mit der methylierungssensitiven Endonuklease BstU1 geschnitten, während das methylierte PCR-Produkt ($\text{SMNPR}_{\text{met}}$) vor dem Verdau durch die Methylierung geschützt wird. Die Behandlung mit der M.SssI Methyltransferase erfolgte für 60 Minuten, der Verdau mit BstU1 ebenfalls für 60 Minuten mit 10U Enzym/ μg DNA.

Anschließend erfolgte die Transfektion gleicher Mengen der Konstrukte in HEK 293T Zellen. Es wurden drei unabhängige Versuche mit drei Messungen pro Versuch durchgeführt ($n=9$). Als Negativkontrolle diente ein pGL4 Konstrukt, welches keinen Promotor besitzt (pGL4 Kontrolle). Die Expression dieser Negativkontrolle war in allen drei Versuchen signifikant geringer als die Expression des Konstrukts mit dem *SMN*-Promotor (pGL4 *SMN*) ($p<0,0001$) und lag bei durchschnittlich weniger als 1% der Aktivität (Abbildung 10), die für das pGL4 *SMN*-Konstrukt gemessen werden konnte. Die Analyse der Luziferaseaktivität zeigte in den HEK293T Zellen nach 24h eine Reduktion der *SMN*-Promotoraktivität mit steigender DNA-Methylierung. So konnte die Promotoraktivität durch 10 minütige Behandlung mit der Methyltransferase im Durchschnitt leicht auf 64,8% ($\pm 18,6\%$) im Vergleich zum unbehandelten pGL4 Konstrukt mit dem *SMN*-Minimalpromotor gesenkt werden. Die Behandlung mit der Methylase für 60 Minuten bewirkt vermutlich eine stärkere Methylierung des *SMN*-Promotors und führt zu einer signifikanten Reduktion der Promotoraktivität ($p<0,009$) auf 35,6% ($\pm 10,9\%$) im Vergleich zum pGL4 *SMN*-Konstrukt.

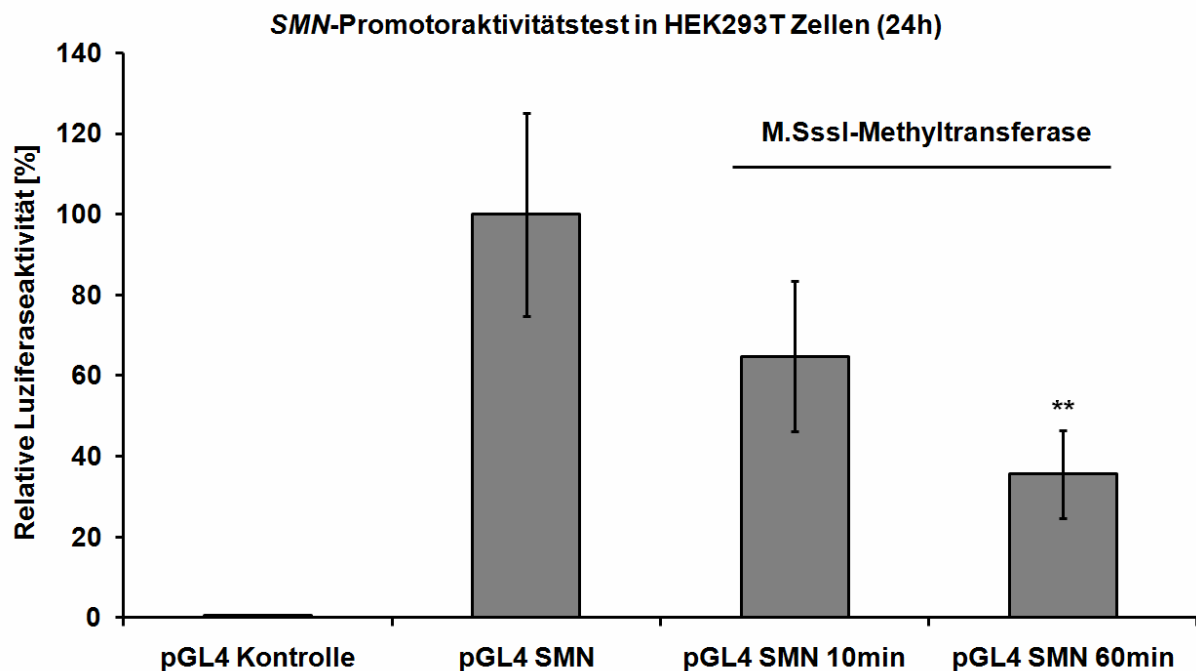


Abbildung 10: Mittelwerte des Promotoraktivitätstests in HEK293T Zellen aus 3 unabhängigen Versuchen. Es erfolgten 3 Messungen je Probe in den einzelnen Versuchen ($n=9$). Das pGL4 Konstrukt mit SMN-Minimalpromotor weist eine deutlich höhere Aktivität auf als das pGL4 Kontrollkonstrukt ohne Promotor. Die Methylierung des pGL4 Vektors mit SMN-Promotor führt bereits nach 10 minütiger Behandlung mit der M.SssI-Methyltransferase zu einer Reduktion der Promotoraktivität im Vergleich zum unbehandelten pGL4 SMN-Konstrukt. Die Behandlung über 60 Minuten bewirkt eine signifikante Reduktion der SMN-Minimalpromotoraktivität auf 35,6% ($\pm 10,9\%$) ($p<0,009$). Es wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Da es sich bei den HEK293T Zellen um embryonale Zellen der Niere handelt, die für Transfektionsexperimente optimiert wurden, sollte dieser Versuch anschließend in einer humanen Vorhaut-Fibroblasten-Zelllinie wiederholt werden, um die erzielten Ergebnisse in einer anderen primären Zelllinie, die aus einem anderen Gewebe gewonnen wurde, zu verifizieren. Die Analyse in den humanen Vorhautfibroblasten (VHFB) zeigte auch hier eine stärkere Luziferaseaktivität für das pGL4 SMN-Konstrukt als für das promotorlose pGL4 Konstrukt (pGL4 Kontrolle). Auch in dieser Zelllinie konnte eine Abnahme der Promotoraktivität mit zunehmender Methylierung des SMN-Promotors gezeigt werden (Abbildung 11). Durch die Methylierung des gesamten pGL4 SMN-Konstrukts für 10 Minuten mit der M.SssI Methyltransferase konnte die Promotoraktivität signifikant auf 40,9% ($\pm 0,8\%$) im Vergleich zum unbehandelten pGL4 SMN-Konstrukt reduziert werden ($p<0,0001$). Die längere Behandlung mit der Methyltransferase reduzierte die Promotoraktivität bzw.

Luziferaseexpression weiter auf 28,2% ($\pm 0,3\%$) und damit unter den Wert für das promotorlose Kontrollkonstrukt (pGL4 Kontrolle) 32,5% $\pm 0,7\%$. Die pGL4 Kontrolle zeigte zwar auch in den Vorhautfibroblasten eine signifikant geringere Aktivität als das pGL4 SMN-Konstrukt, der Vergleich mit den Expressionswerten in HEK293T Zellen zeigt für die Kontrolle jedoch höhere relative Werte. Dies ist vermutlich auf zelltypspezifische Unterschiede in der Expression der Luziferasekonstrukte zurückzuführen.

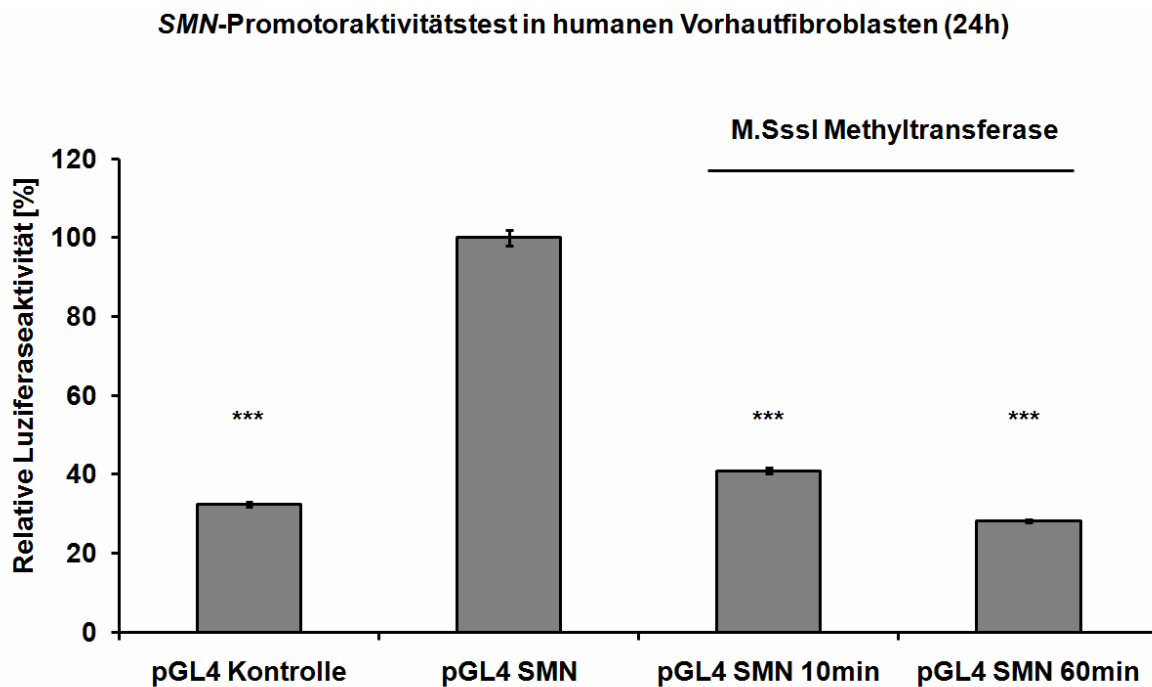


Abbildung 11: Promotoraktivitätstest in humanen Vorhautfibroblasten (n=4): Die vollständige Methylierung des pGL4 Vektors mit SMN-Promotor führt zu einer signifikanten Reduktion der Promotoraktivität auf 28,2% ($\pm 0,3\%$) im Vergleich zum unbehandelten pGL4 SMN Vektor. Bereits nach 10 minütiger Behandlung mit der Methyltransferase wird eine Reduktion der Aktivität um 60% erreicht. Es wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Da in den beiden gezeigten Versuchen jeweils die gesamten transfizierten Vektoren mit der M.SssI Methyltransferase behandelt wurden, ist nicht auszuschließen, dass die Methylierung des pGL4 Vektorrückgrates die Expression des gesamten Konstrukts reduziert. Um sicherzustellen, dass dieser Effekt keine Rolle spielt, wurden PGL4 SMN-Konstrukte hergestellt, bei denen der SMN-Promotorbereich vor der Klonierung in den pGL4 Vektor mit der M.SssI Methyltransferase behandelt wurde, so dass nur der Promotorbereich methyliert vorliegt. Um die Vergleichbarkeit

der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die unmethylierte Kontrollkonstrukte pGL4 SMNPR_{unmet} und die Konstrukte mit vollständig methyliertem Promotor pGL4 SMNPR_{met} parallel ligiert und aufgereinigt. Der Vergleich zwischen vollständig methylierter und unmethylierter Promotorregion zeigt auch hier eine deutliche Reduktion der Luziferaseaktivität auf 31,7% ($\pm 1,4\%$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Behandlung mit der Methyltransferase (Abbildung 12). Die Reduktion der Promotoraktivität war statistisch signifikant ($p=0,00009$).

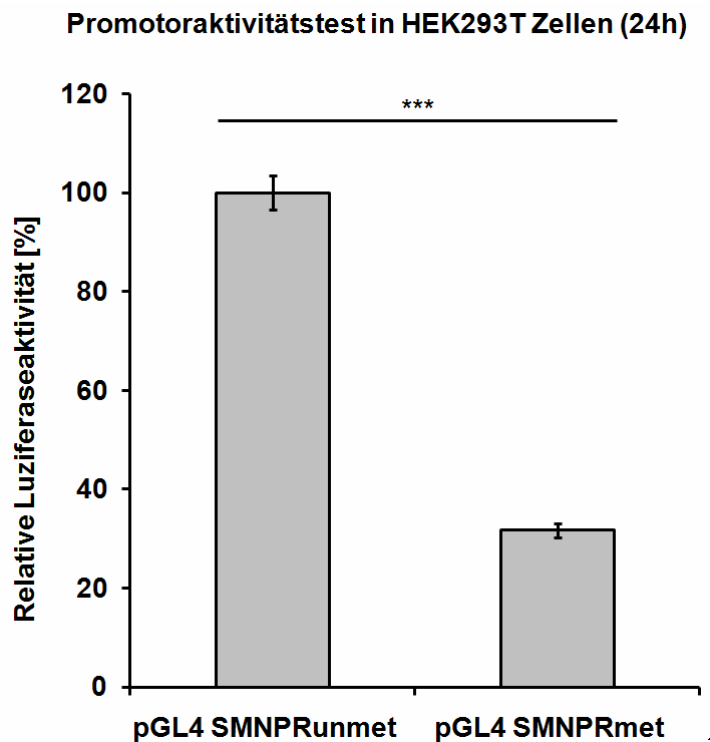


Abbildung 12: Promotoraktivitätstest in HEK293T Zellen (n=4): Durch Klonierung des methylierten SMN-Minimalpromotors wurden Effekte durch die Methylierung des Vektors ausgeschlossen. Auch hier zeigt sich eine signifikante Reduktion der Promotoraktivität durch die Methylierung des SMN-Minimalpromotors auf 31,7% ($\pm 1,4\%$) im Vergleich zur Kontrolle. Es wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Als weiterer Test wurde der Effekt der Methyltransferase auf den SMN Minimalpromotor mit dem Effekt auf den Herpes-Simplex-Virus Thymidin-Kinase-Promotor (HSV-TK Promotor) verglichen. Hierfür wurde das pGL4TK Konstrukt der Firma *Promega* verwendet. Die Analyse des 752 bp langen HSV-TK Promotors mit dem CpG-plot Programm (www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/) zeigte, dass diese Sequenz einen 649 bp großen Bereich mit hoher CpG-Dichte enthält (siehe Abbildung 58 im Anhang). Wie eingangs beschrieben, sind solche CpG-Inseln in Promotorregionen oft unmethyliert und die Promotoraktivität kann durch Methylierung

in diesen CpG-Inseln reguliert werden. Die beiden Konstrukte pGL4TK und pGL4SMN mit identischem Vektorrückgrat wurden für unterschiedliche Zeiträume mit der CpG-Methyltransferase behandelt. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, hat die *in vitro* Methylierung der Konstrukte mit dem HSV-TK Promotor keine signifikante Auswirkung auf die Luziferaseaktivität, die Promotoraktivität wird also nicht durch DNA-Methylierung beeinflusst, auch die Methylierung des Vektor hat keinen Einfluss auf die Expression der Luziferase (Abbildung 13). Die parallel durchgeführte Methylierung des Konstrukts mit dem SMN-Minimalpromotor hingegen zeigt bereits nach 10-minütiger CpG-Methyltransferase Behandlung eine Reduktion der Promotoraktivität um mehr als 80% auf 17,8% ($\pm 1,3\%$). Die Behandlung für 60 Minuten bewirkte eine signifikante Abnahme der Promotoraktivität auf etwa 10,3% ($\pm 0,1\%$) im Vergleich zur unbehandelten Probe.

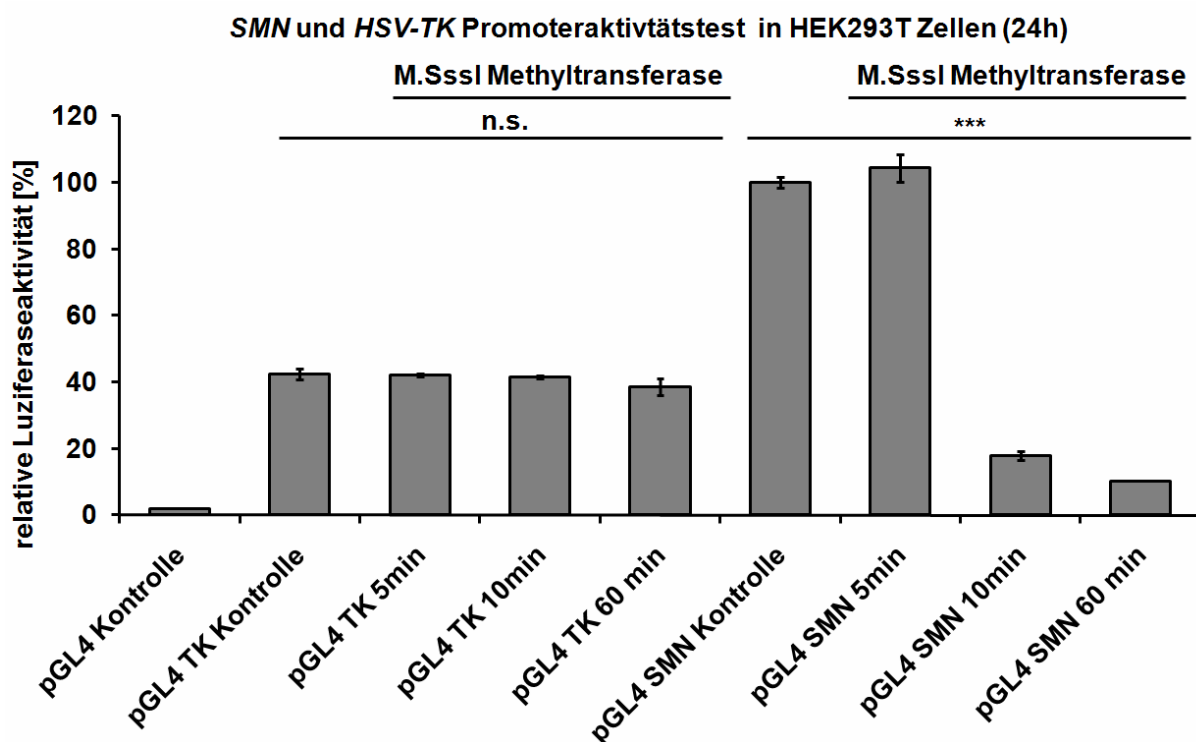


Abbildung 13: Vergleich der SMN-Promotoraktivität nach Methyltransferasebehandlung in HEK293T Zellen: Die Behandlung des TK Promotors für 60 Minuten bewirkt nur eine minimale Reduktion der Promotoraktivität um 10% im Vergleich zum unbehandelten Konstrukt. Diese Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant. Die Methylierung des SMN-Minimalpromotors hingegen führt bereits nach 10 Minuten zur Reduktion der Promotoraktivität um mehr als 80%. Nach 60 minütiger Behandlung mit der Methyltransferase ist nur noch eine Restaktivität von 10,3% ($\pm 0,1\%$) messbar ($p < 0,0001$). Es wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die hier gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Aktivität des SMN-Minimalpromotors (Position -13 bis -456 relativ zum ATG) durch Methylierung signifikant reduziert werden kann. Dieser Effekt konnte nicht nur in HEK293T Zellen gezeigt werden, sondern auch in primären Vorhautfibroblasten reproduziert werden (Abbildung 11). Ein Seiteneffekt durch die Methylierung des Vektorrückgrates wurde durch die oben gezeigten Ergebnisse ausgeschlossen (siehe Abbildung 12). Die Aktivität des HSV-TK Promotors hingegen wird nicht durch die Methylierung der CpG-Dinukleotide reguliert. Auch konnte durch diese Versuche erneut ausgeschlossen werden, dass die Methylierung des Vektors die Expression der Luziferase beeinträchtigt. Dies bestätigt die in Abschnitt 4 gezeigten Daten und deutet auf eine wichtige Rolle der DNA-Methylierung in der Regulation der *SMN*-Expression hin.

5.2 Methylierungsanalysen

5.2.1 *SMN2*-Promotormethylierung in den Fibroblastenzelllinien ML5 und ML16

Wie oben beschrieben, konnte durch genomische Sequenzierung mittels Klonierung und Sequenzierung nach Bisulfitbehandlung gezeigt werden, dass die Promotorregion des *SMN2*-Gens methylierte CpG reiche Sequenzen (CpG Inseln) enthält. Dabei zeigte sich für ^{*SMN*}CGI 1 und ^{*SMN*}CGI 4 eine nahezu vollständige Methylierung, ^{*SMN*}CGI 2 war nur teilweise methyliert und in ^{*SMN*}CGI 3 konnte keine Methylierung nachgewiesen werden (Abbildung 8). Da die Analyse der Methylierung mittels Klonierung und Sequenzierung sehr arbeitsintensiv ist und nur ungenaue Methylierungswerte liefert sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit zunächst die Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels Pyrosequenzierung für die *SMN*-Genkopien etabliert werden. Hierfür wurde zunächst das Methylierungsprofil für die Zelllinien ML5 und ML16 erstellt. Für die Analyse der Methylierung durch Pyrosequenzierung erfolgte die Amplifikation jeder der 4 CpG-Inseln des *SMN2*-Promotors durch eine *outer PCR* mit Primern, die für die Bisulfit behandelte DNA spezifisch sind. Anschließend erfolgte die weitere Amplifikation durch eine sogenannte *inner PCR* mit biotinylierten Rückwärts- oder Vorwärtsprimern. Für die Analyse wurden anschließend die Biotin markierten Einzelstränge aufgereinigt. Die Quantifizierung der Methylierung erfolgte schließlich im Pyrosequenziergerät. Hier wurde die Methylierung aller CpG-Dinukleotide einmal gemessen (n=1). Wie in Abbildung 14 dargestellt, konnten mittels Pyrosequenzierung ähnliche Ergebnisse wie durch die Klonierung und Sequenzierung erhalten werden. So zeigte sich für das ^{*SMN2*}CGI 1 eine durchschnittliche Methylierung von 87% (ML5) bzw. 88% (ML16), während dieser Wert für das ^{*SMN2*}CGI 4 bei 77% (ML5) bzw. 74% (ML16) lag. Die Methylierung des ^{*SMN2*}CGI 2 variiert in beiden Zelllinien zwischen 74% und 7%, wobei der Mittelwert für das ganze CGI bei 37% bzw. 38% liegt. Für ^{*SMN2*}CGI 3 konnten in beiden Zelllinien nur sehr geringer Methylierungswerte gemessen werden, der Mittelwert liegt bei 7% bzw. 6%.

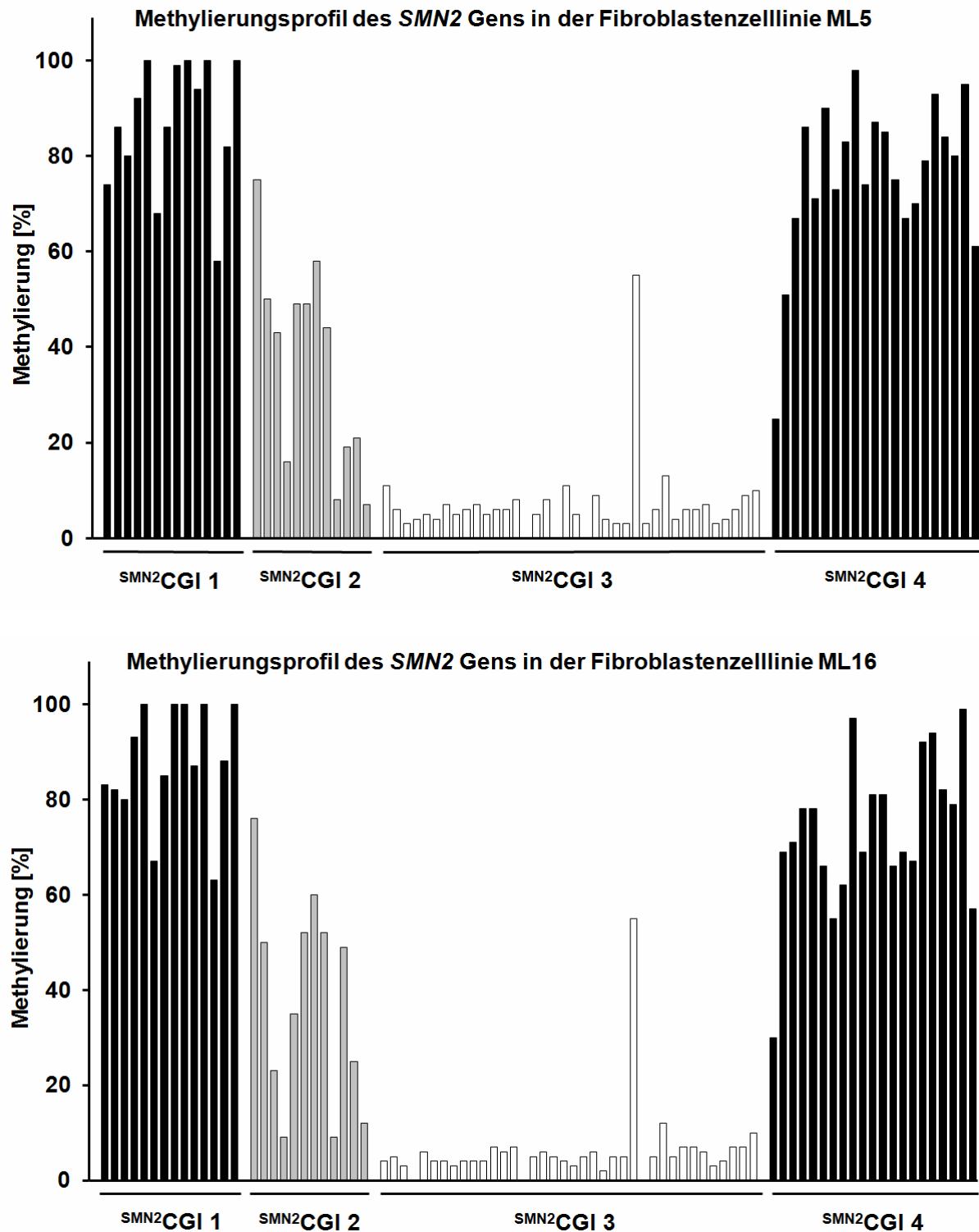


Abbildung 14: Methylierungsprofile der SMA-Fibroblastenzelllinien ML5 (3 *SMN2*-Kopien) oben und ML16 (ebenfalls 3 *SMN2*-Kopien) unten nach Pyrosequenzierung (n=1): Die Mittelwerte der Methylierung betragen für ML5: *SMN2*CGI 1: 87,1%, *SMN2*CGI 2: 36,6%, *SMN2*CGI 3: 6,9%, *SMN2*CGI 4: 75,9% und für ML16: *SMN2*CGI 1: 87,7%, *SMN2*CGI 2: 37,7%, *SMN2*CGI 3: 6,2%, *SMN2*CGI 4: 73,4%.

5.2.2 Die Methylierung des *SMN2*-Promotors korreliert in Blutproben von SMA-Patienten mit 2 *SMN2*-Kopien mit dem Schweregrad der Erkrankung

Die bisher gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass das *SMN2*-Gen methylierte Bereiche in der Promotorregion aufweist und dass die Promotoraktivität des *SMN2*-Gens mit der Methylierung der Promotorregion korreliert. Hierbei handelt es sich jedoch nur um *in vitro* Ergebnisse, deren Bedeutung für die Pathogenese der SMA unklar ist. Wie oben beschrieben, korreliert der Schweregrad der SMA meist mit der *SMN2*-Kopienzahl. Bei 2 *SMN2*-Kopien ist ein schwerer Krankheitsverlauf sehr wahrscheinlich, eine SMA Typ III kommt bei Patienten mit 2 *SMN2*-Kopien nur sehr selten vor (~2%). Dies lässt vermuten, dass weitere bislang unbekannte Faktoren an der Ausprägung der SMA beteiligt sind. Um zu untersuchen, ob die Ursache für dieses Phänomen in der Methylierung der *SMN2*-Genkopien zu finden ist, sollte das *SMN2*-Methylierungsprofil in der DNA aus Blutproben von Patienten bestimmt werden, bei denen die *SMN1*-Genkopien deletiert sind, und die die gleiche Anzahl an *SMN2*-Kopien tragen, aber an unterschiedlichen SMA-Subtypen erkrankt sind. Obwohl es sich bei Blut nicht um das bei der SMA primär betroffene Gewebe handelt, sollten die Ergebnisse doch auch Rückschlüsse auf die Gegebenheiten in den α -Motoneuronen zulassen, da Untersuchungen der Methylierung auf den Chromosomen 6, 20 und 22 zeigten, dass sich die Methylierung zwischen den Geweben eines Individuums nur geringfügig unterscheidet (Eckhardt, et al. 2006).

Bei 17 Patienten aus unserem Patientenkollektiv (Tabelle 10) wurde der Methylierungsgrad für jedes CpG Dinukleotid bestimmt. Bei diesen Patienten handelt es sich um 10 nichtverwandte Typ I SMA Patienten (6 weiblich und 4 männlich), sowie 7 nichtverwandte SMA Typ III Patienten (4 weiblich und 3 männlich), die jeweils 2 *SMN2* Kopien tragen. Die genomische Sequenzierung nach Bisulfitbehandlung ergab für die Typ I Patienten ein ähnliches Methylierungsprofil wie schon für die SMA Fibroblastenzelllinien (ML5, ML16). Dies lässt vermuten, dass sich die Methylierungsmuster zwischen den verschiedenen Geweben nicht essentiell unterscheiden. Erneut zeigte sich, dass ^{*SMN2*}CGI 1 und ^{*SMN2*}CGI 4 hypermethyliert sind. ^{*SMN2*}CGI 3 ist hypomethyliert mit einem einzelnen Ausreißer an Position +89, hier konnte in den Patientengruppen eine Methylierung von 54,9% (\pm 2,9%) in den Typ I bzw. 55,3% (\pm 3,4%) in den Typ III Patienten gemessen werden. Das ^{*SMN2*}CGI 2 hingegen weist intermediäre Methylierungswerte auf.

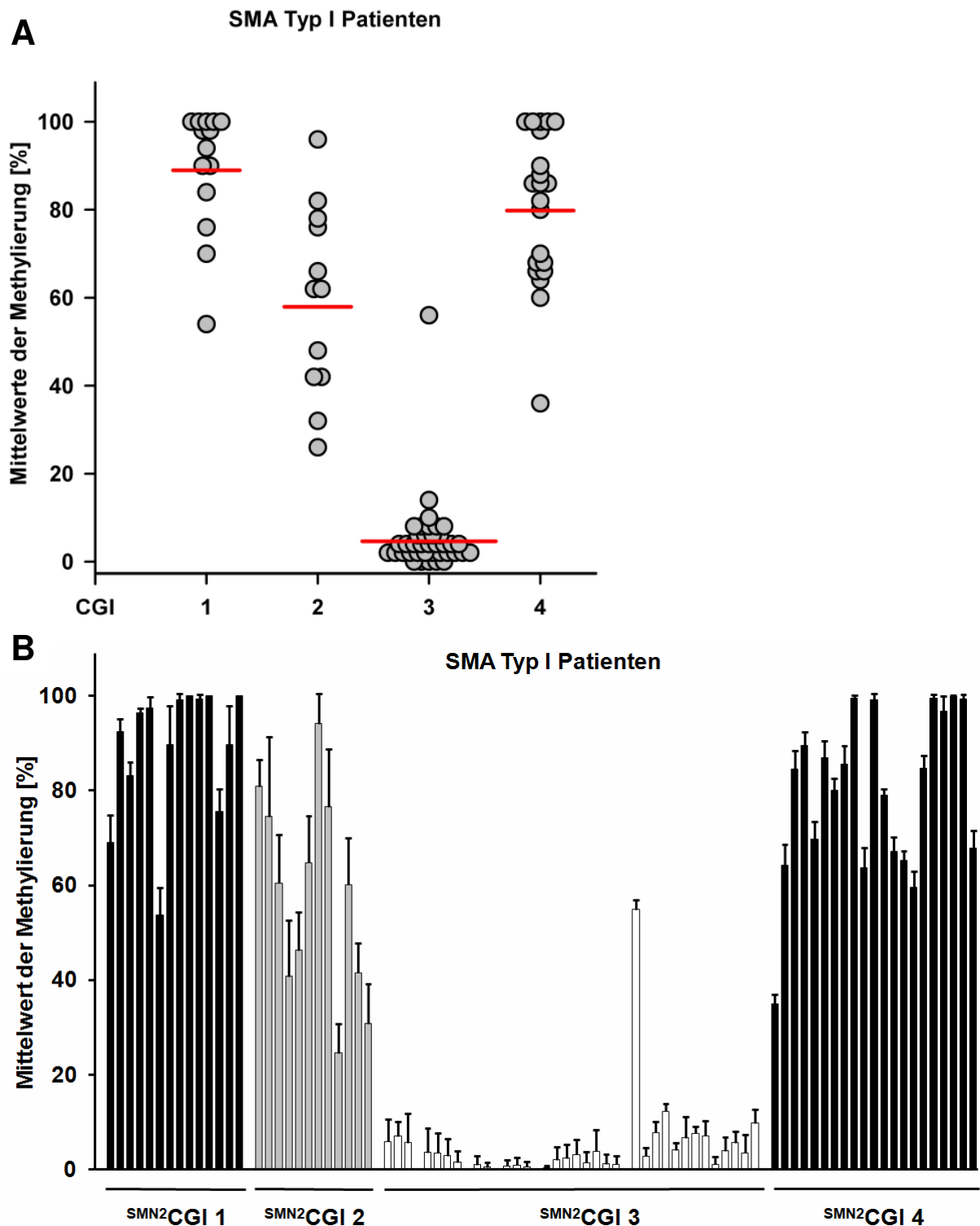


Abbildung 15: Das *SMN2*-Methylierungsmuster ist in Blutproben von 10 SMA Typ I Patienten mit 2 *SMN2*-Kopien hoch konserviert. (A) Die Mittelwerte der Methylierung der CpG-Inseln (dargestellt als Balken im *Frequency Plot*) betragen für *SMN2*CGI 1: 89,1%, *SMN2*CGI 2 58,0%, *SMN2*CGI 3 4,6% und *SMN2*CGI 4 79,9%. (B) Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der Methylierung jedes CpG-Dinukleotids in den vier CpG-Inseln und die Mittelwertabweichung. Die geringe Mittelwertabweichung zeigt die geringe interindividuelle Varianz der Methylierung.

Die Analyse der DNA-Proben aus Blut der 7 SMA Typ III Patienten mit Deletion des *SMN1*-Gens und 2 *SMN2*-Genkopien (Abbildung 16), zeigte ebenfalls nur geringe Methylierungsunterschiede zwischen den einzelnen Typ III Patienten. Das Methylierungsmuster entsprach im Wesentlichen dem der SMA Typ I Patienten und der Vergleich der Mittelwerte der Methylierung der CpG-Inseln zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Typ I und Typ III Patienten. Die Methylierungswerte für die einzelnen CpG-Dinukleotide weisen nur geringe Abweichungen zwischen den 10 SMA Typ I Patienten bzw. den 7 SMA Typ III Patienten auf (Abbildung 15, Abbildung 16).

Der paarweise Vergleich der Methylierung für jedes einzelne CpG-Dinukleotid zeigte für 7 Positionen (-871, -695, -296, -290, +855, +988, +1103) signifikante Methylierungsunterschiede, die mehr als 10 Prozentpunkte betragen (Abbildung 17). An sechs der 7 Positionen (-871, -695, -296, -290, +855, +1103) weisen die Typ I Patienten signifikant mehr Methylierung auf als die Typ III Patienten, die Methylierung scheint also mit dem Schweregrad der Erkrankung zu korrelieren. Sehr interessant an diesen Ergebnissen ist, dass der größte Unterschied an Position -296 (SMA Typ I Patienten $94,1\% \pm 6,3\%$, SMA Typ III Patienten $66,7\% \pm 8,0\%$ und $p=0,00084$, t-Test) mit dem ersten der drei Transkriptionsstartpunkte des *SMN2*-Gens übereinstimmt (vergl. Abbildung 7).

Die Korrelation der CpG-Methylierung aller 17 Patienten mit dem Geschlecht (10 weiblich und 7 männlich) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse passen zu neueren Erkenntnissen aus der vergleichenden Analyse der Methylierung des menschlichen Genoms (Eckhardt, et al. 2006), die zeigen, dass das Geschlecht weniger Einfluss auf die DNA-Methylierung hat als bisher gedacht.

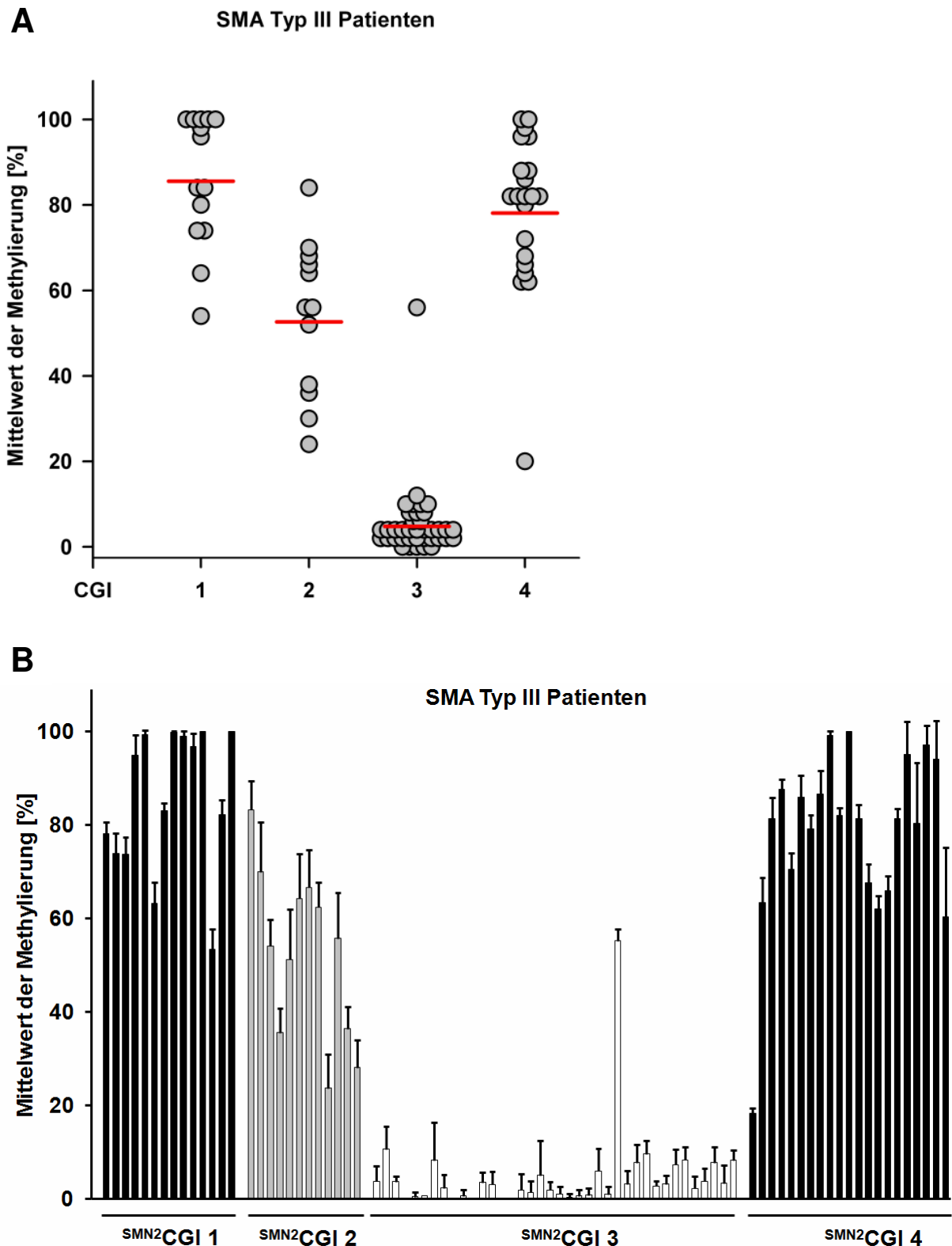


Abbildung 16: Das *SMN2*-Methylierungsmuster ist in Blutproben von 7 SMA Typ III Patienten mit 2 *SMN2*-Kopien hoch konserviert. (A) Die Mittelwerte der Methylierung (Balken im *Frequency-Plot*) betragen für *SMN2*CGI 1: 85,5%, *SMN2*CGI 2 52,6%, *SMN2*CGI 3 4,8% und *SMN2*CGI 4 78,1%. (B) Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der Methylierung jedes CpG-Dinukleotids in den vier CpG-Inseln und die Mittelwertabweichung. Die Patienten zeigen nur geringe interindividuelle Methylierungsunterschiede für die einzelnen CpG-Dinukleotide.

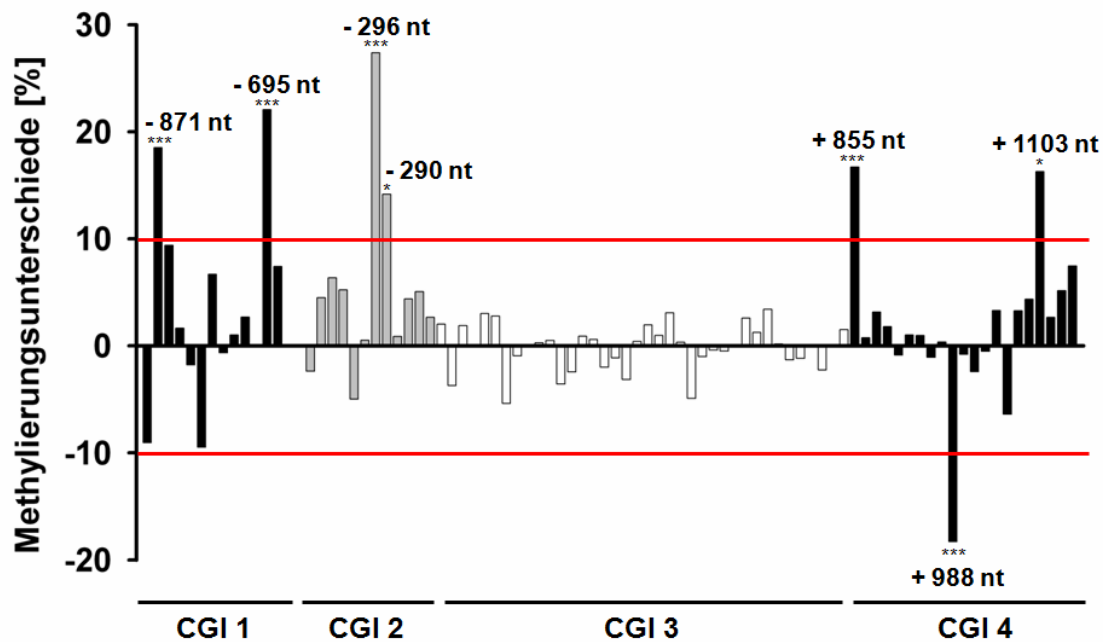


Abbildung 17: Der Vergleich der Mittelwerte der Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide zwischen den SMA Typ I und Typ III Patienten zeigt 7 Positionen mit signifikanten Methylierungsunterschieden, die größer als 10% sind. Dabei korreliert die Methylierung an 6 der 7 Positionen mit dem Schweregrad der Erkrankung. Die Unterschiede betragen an Position -871: 18,5%, -695: 22,1%, -296: 27,4%, -290: 14,2%, +855: 16,7%, +988: -18,3% und +1103: 16,3%. Dabei wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Die Unterschiede sind in Prozentpunkten angegeben)

5.2.3 Die Methylierung des *SMN2*-Gens in SMA-Fibroblasten korreliert ebenfalls mit dem Schweregrad der Erkrankung

Um die Korrelation zwischen der Methylierung des *SMN2*-Gens und dem Schweregrad der Erkrankung zu bestätigen, wurden Fibroblastenzelllinien von drei nicht verwandten *SMN1*-deletierten SMA-Patienten mit 2 *SMN2*-Genkopien untersucht. Die mehrfache Quantifizierung der Methylierung ($n \geq 6$) an den Positionen -296 und -290 (beide in *SMN2*CGI2) zeigte eine signifikante Korrelation der Methylierung an diesen Positionen mit dem Schweregrad in den Typ I (ML17), Typ IIIa (ML22) und Typ IIIb (ML74) SMA-Fibroblasten (Abbildung 18). Die Methylierung an Position -296 beträgt in den ML17 Zellen 80,1% ($\pm 9,5\%$), in den ML22 Zellen

64,3% ($\pm 5,8\%$) und in den ML74 Zellen 51,3% ($\pm 6,6\%$). Die Unterschiede zwischen ML17 und den beiden Typ III Zelllinien betragen 15,8% bzw. 28,8% und sind signifikant ($p < 0,0001$). An Position -290 konnte in ML17 ein Methylierungswert von 64,7% ($\pm 14,8\%$) gemessen werden, in ML22 beträgt die Methylierung 55,3% ($\pm 7,8\%$) und in ML74 nur 42,0% ($\pm 7,3\%$). Der Unterschied zwischen ML17 und ML22 an der Position -290 liegt bei 9,4% ($p = 0,02$). Der Unterschied zwischen ML17 und ML22 beträgt an dieser Position 22,7% ($p < 0,001$). Für die übrigen 5 Positionen (-871, -695, +855, +988, +1103), die in den Blutproben der SMA Patienten signifikante Unterschiede zeigten, konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

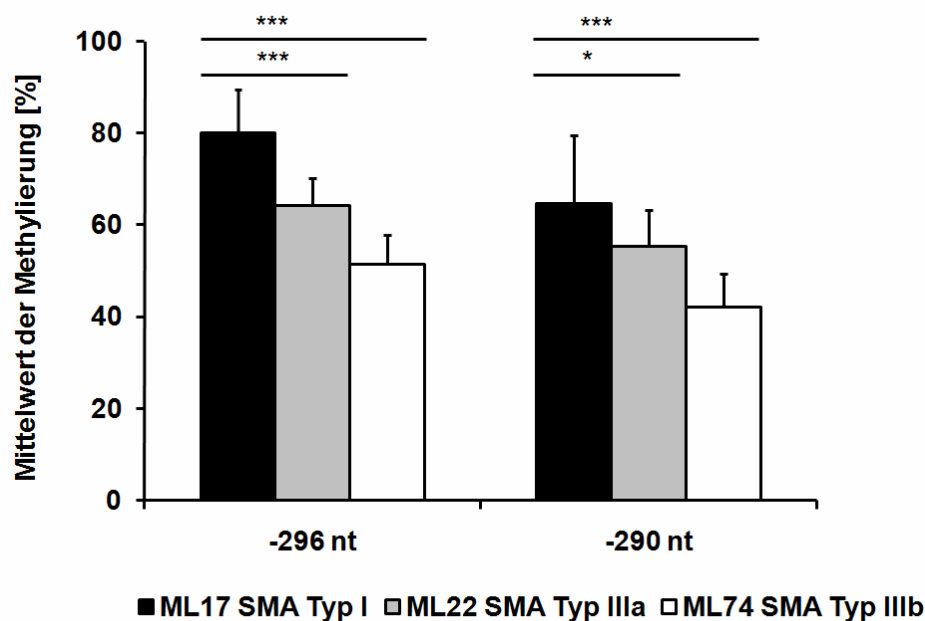


Abbildung 18: Methylierung der CpG-Dinukleotide an den Positionen -296 und -290 in den SMA Fibroblastenzelllinien ML17, ML22 und ML74 die *SMN1* deletiert sind und 2 *SMN2* Kopien tragen. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der Methylierung und den Fehler des Mittelwertes an den Positionen -296 und -290. An beiden Stellen zeigt die Fibroblastenzelllinie ML17 (SMA Typ I) signifikant höhere Methylierungswerte als die anderen beiden Zelllinien, die von Typ IIIa (ML22) bzw. Typ IIIb (ML74) Patienten stammen. Drei Stufen der Signifikanz wurden unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Da sich die beiden CpG-Dinukleotide an den Positionen -296 und -290 in unmittelbarer Nähe zum ersten Transkriptionsstartpunkt befinden, liegt die Vermutung nah, dass die Methylierung dieser CpG-Dinukleotide die Expression des *SMN2*-Transkripts von diesem Transkriptionsstartpunkt beeinflussen. Das Transkript vom ersten Transkriptionsstartpunkt wird im folgenden *LT-SMN2 (long transcript SMN2)* genannt. Durch die Verwendung verschiedener Primerkombinationen, welche spezifisch nur das *LT-SMN2* amplifizieren, konnte mittels semiquantitativer RT-PCR

eine inverse Korrelation zwischen der Methylierung an den Positionen -296 und -290 und den *LT-SMN2*-Transkriptmengen in den Fibroblastenzelllinien ML17, ML22 und ML74 gezeigt werden (

Abbildung 19).

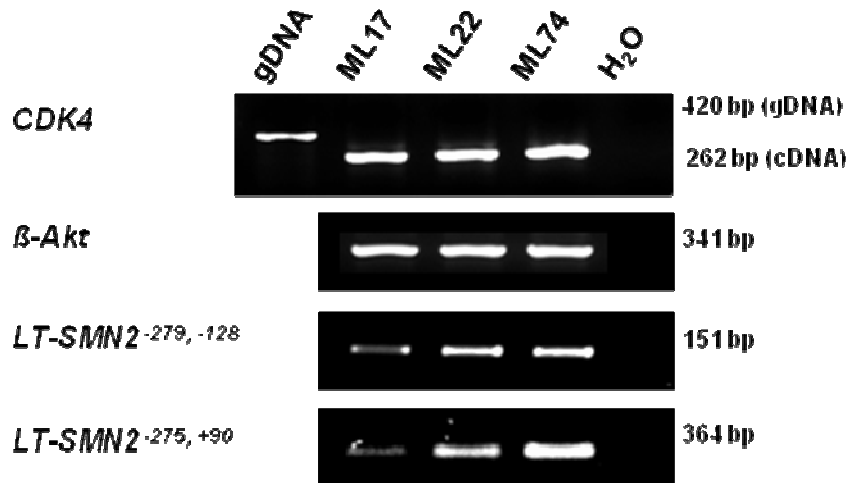


Abbildung 19: RT-PCR zur Analyse der *LT-SMN2*-Transkriptmengen. Die Analyse der *LT-SMN2* Transkriptmengen zeigt eine deutlich höhere Expression des *LT-SMN2*-Transkripts vom ersten Transkriptionsstartpunkt in den Zelllinien ML22 und ML74, die niedrigere Methylierungswerte an den Positionen -296 und -290 aufweisen und von Typ IIIa bzw. Typ IIIb SMA-Patienten stammen. Dieser Effekt konnte durch zwei verschiedene Primerkombinationen nachgewiesen werden. Die CDK4 Primer wurden verwendet, um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen (Produktgröße bei Kontamination mit genomischer DNA 420 bp und 262 bp, wenn nur cDNA vorhanden ist. B-Aktin diente als interne Kontrolle, um gleiche cDNA Mengen sicherzustellen.

Diese Ergebnisse konnten mittels *real-time* PCR verifiziert werden, welche eine genauere Quantifizierung der *LT-SMN2*-Transkripte ermöglichte. Demnach zeigt die Zelllinie ML22 eine um 52% (+29% / -24%) signifikant höhere Expression als die Fibroblasten ML17 ($p=0,04$), und die Fibroblasten ML74 zeigen sogar 68% (+13% / -12%) mehr *LT-SMN2*-Transkripte ($p=0,02$) als die Zelllinie ML17 (Abbildung 20). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der *SMN2*-Proteinmenge in den Zelllinien gefunden werden, vermutlich da das *LT-SMN2*-Transkript weniger als 5% der gesamten *SMN2*-Transkriptmenge in diesen Zellen ausmacht (Daten hier nicht gezeigt).

**Expression des *LT-SMN2*-Transkripts
in den Fibroblastenzelllinien ML17, ML22 und ML74**

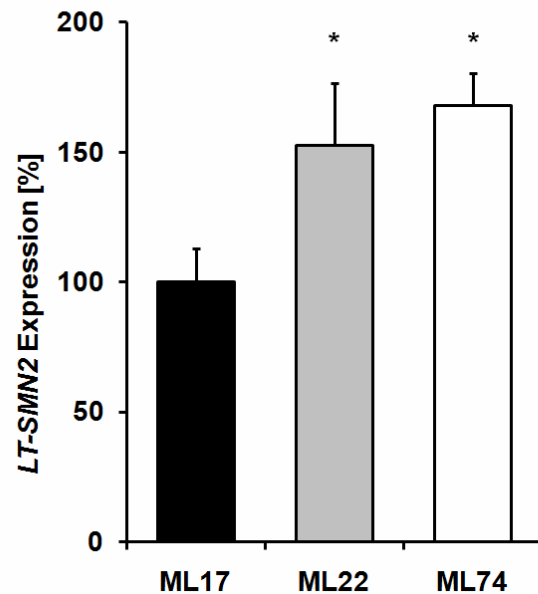


Abbildung 20: *Real-time* PCR zur Quantifizierung der *LT-SMN2*-Transkripte relative zu β -Aktin. Durch die Analyse mittels *real-time* PCR konnten die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR bestätigt werden. Die Zelllinien ML22 152% (+29% / -24%) und ML74 168% (+13% / -12%) zeigen eine signifikant höhere *LT-SMN2*-Expression im Vergleich zu den Fibroblasten des SMA Typ I Patienten (ML 17). Die Werte sind als Mittelwerte der Prozentwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die Expression von ML17 angegeben, dessen Werte auf 100% gesetzt wurden (*= $p < 0,05$).

5.2.4 Die Aktivität der Methyltransferasen korreliert in SMA-Fibroblasten mit dem Schweregrad der Erkrankung

Methyltransferaseaktivität in den Fibroblastenzelllinien ML17, ML22 und ML74

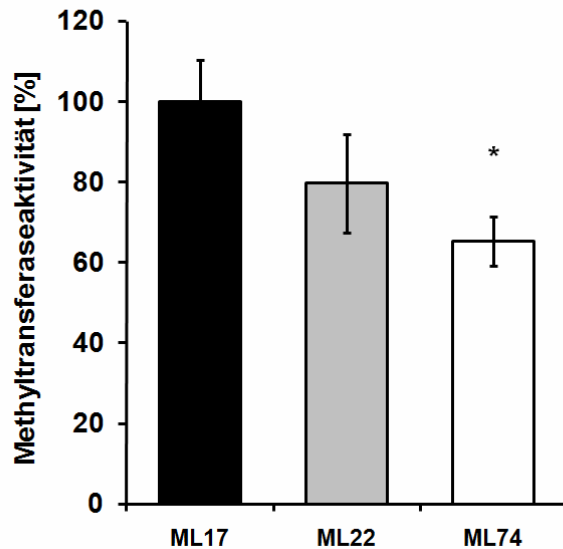


Abbildung 21: Methyltransferaseaktivitätsmessung in Zelllysaten der SMA-Fibroblastenzelllinien ML17, ML22 und ML74: Die Messung erfolgte in Triplikaten ($n=3$). Die Zelllysate der SMA Typ III Patienten weisen eine Reduktion der Methyltransferaseaktivität um 20,3% ($\pm 12,1\%$) für die ML22 Zellen auf ($p=0,16$), in den ML74 Zellen konnte eine signifikante Reduktion um 34,8% ($\pm 6,1\%$) gemessen werden ($p<0,05$).

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der Methylierung zwischen den drei Zelllinien durch die Aktivität der Methyltransferasen zu erklären sind, wurde eine Messung der Aktivität der Methyltransferasen in Lysaten aus den drei Zelllinien durchgeführt. Der Vergleich zeigt für die Zelllinie ML22 eine um etwa 20% verringerte Aktivität der Methyltransferasen. In den Lysaten der Zelllinie ML74 waren nur noch etwa 65% der Methyltransferaseaktivität verglichen mit ML17 messbar. Die gemessene Aktivität der Methyltransferasen korreliert also in diesen Fibroblasten mit dem Schweregrad der Erkrankung. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den zuvor gezeigten Methylierungsanalysen und erklären möglicherweise die Methylierungsunterschiede zwischen den Zelllinien von Patienten mit unterschiedlichem SMA-Schweregrad.

5.2.5 Methylierung des *SMN1*-Gens ist nicht ursächlich für die SMA

Neben den klassischen SMA-Patienten, die wie oben beschrieben eine homozygote Deletion des *SMN1*-Gens aufweisen und eine unterschiedliche Anzahl an *SMN2*-Genkopien zeigen, findet sich in unserem Patientenkollektiv auch eine kleine Zahl von SMA-Patienten, die eine genotypische Besonderheit aufweisen. Diese Patienten besitzen keine *SMN2*-Genkopien jedoch eine oder mehrere *SMN1*-Genkopien. Sie erkranken dennoch an anderen Entitäten der SMA (Tabelle 10). Um zu untersuchen, ob in diesen SMA-Patienten eine aberrante Methylierung der *SMN1*-Promotorregion ursächlich für das Auftreten der Krankheitssymptome sein kann, wurde die Methylierung des ^{SMN}CGI2 in DNA aus Blutproben von 5 SMA Patienten und 7 Kontrollen mit Deletion der *SMN2*-Kopien und 2 *SMN1*-Kopien untersucht.

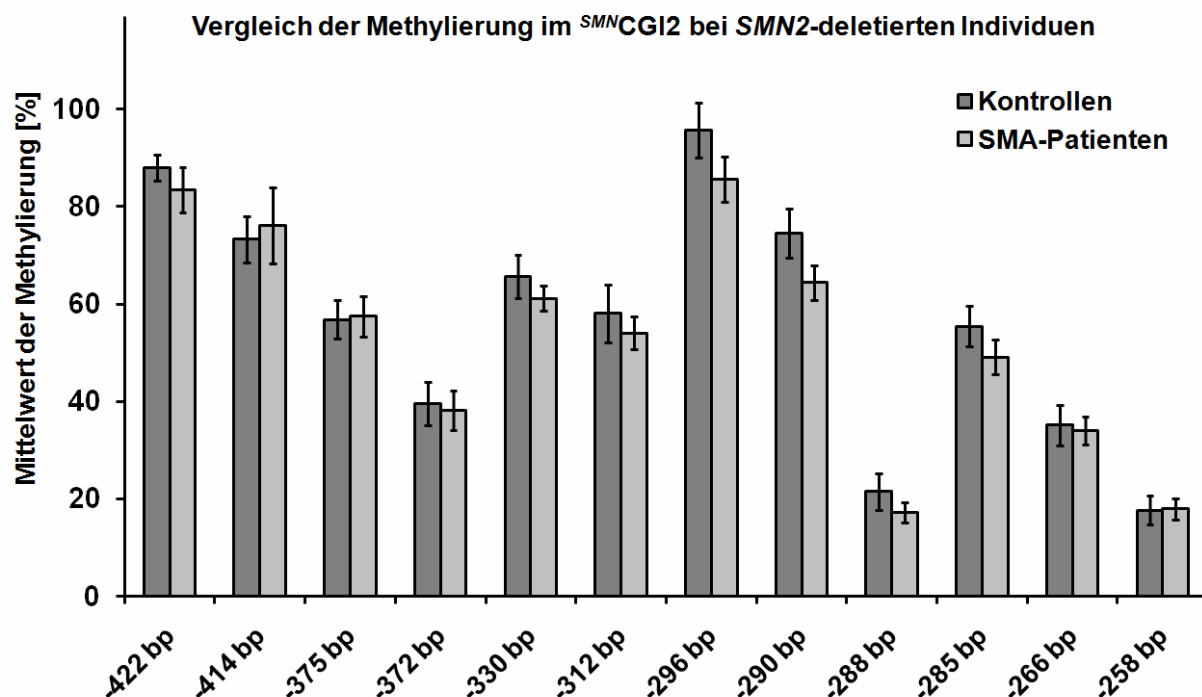


Abbildung 22: Vergleich der Mittelwerte der Methylierung zwischen *SMN2*-deletierten gesunden Kontrollen (n=7) und ebenfalls *SMN2*-deletierten SMA-Patienten (n=5) mit 2 *SMN1* Kopien. Im Säulendiagramm dargestellt sind die Mittelwerte der CpG-Dinukleotide in ^{SMN1}CGI2 und die Mittelwertabweichung. Untersucht wurden 7 Kontrollen (5 weiblich und 2 männlich) und 5 SMA Patienten (3 weiblich und 2 männlich). Es zeigen sich im ^{SMN1}CGI2 keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und SMA-Patienten.

Der Vergleich des Methylierungsgrades der einzelnen CpG-Dinukleotide in ^{SMN1}CGI2 zwischen Kontrollen und SMA-Patienten zeigte keine signifikanten Unterschiede

zwischen diesen Gruppen (Abbildung 22). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Erkrankung der SMA-Patienten, die eine Deletion der *SMN2*-Kopien zeigen, ein anderer, bislang nicht bekannter Pathomechanismus zugrunde liegt.

5.2.6 Vergleich der *SMN1*- und *SMN2*-Methylierung

Um zu überprüfen ob die Methylierungsmuster zwischen *SMN1*- und *SMN2*-Genkopien grundlegende Unterschiede aufweisen wurden die Methylierungsmuster der *SMN1*-Genkopie im *SMN1* CGI2 von *SMN2*-deletierten SMA-Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad mit der *SMN2*-Methylierung im *SMN2* CGI2 in den SMA Typ I Patienten verglichen (Abbildung 23).

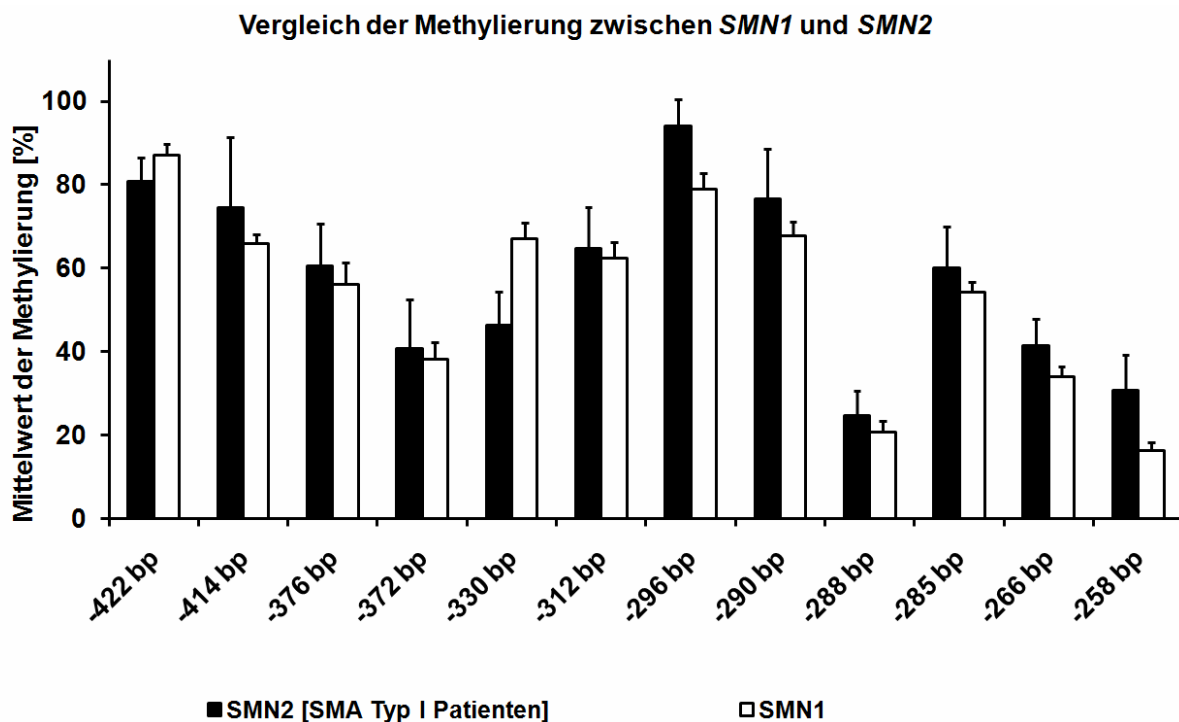
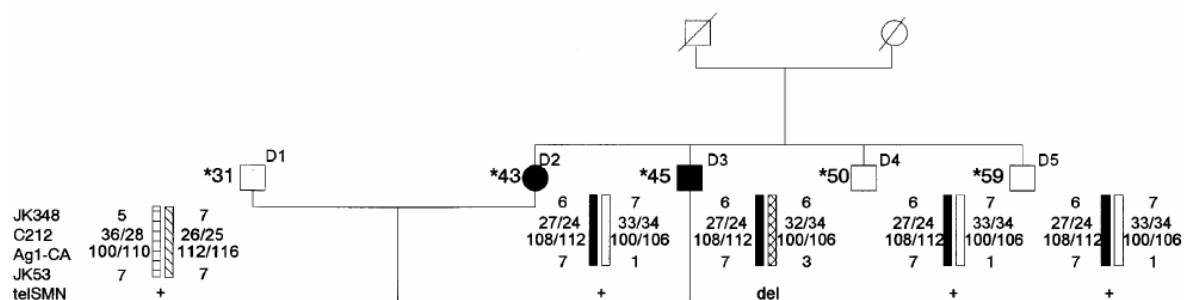


Abbildung 23: Vergleich der Methylierung zwischen den *SMN1*-Genkopien (SMA Patienten) und den *SMN2*-Genkopien (SMA Typ I und Typ III Patienten)

Der Vergleich zeigt für *SMN1* CGI2 ein ähnliches Methylierungsprofil wie bereits für *SMN2* CGI2 beschrieben. Der paarweise Vergleich einzelner CpG-Dinukleotide zeigte signifikante Differenzen an folgenden Positionen: -330 +20,7% in *SMN1* ($p < 0,001$), -296 -15,3% in *SMN1* ($p < 0,001$), -266 -7,5% ($p < 0,04$) in *SMN1* und -258 -14,5% in *SMN1* ($p < 0,01$). Nur an Position -330 zeigten die *SMN1*-Genkopien deutlich mehr

Neben den bereits beschriebenen Patienten, die einen vom Genotyp abweichenden Phänotyp aufweisen, sind uns mehrere Familien bekannt, in denen Geschwister die für die *SMN*-Genregion haploidentisch sind und alle an einer SMA erkranken müssten, trotzdem abweichende Phänotypen aufweisen. In diesen sogenannten „diskordanten Familien“ können sogar einige Geschwister komplett gesund sein, während die anderen an einer SMA erkranken (Feldkotter, et al. 2002, Hahnen, et al. 1995, Wirth, et al. 1997).

In einigen dieser Familien sollte nun untersucht werden, ob möglicherweise Veränderungen der Methylierung in der kritischen Region im ^{SMN}CGI2 für die diskordanten Phänotypen der haploidentischen Geschwister ursächlich sind. Hierfür standen uns DNA Proben aus Vollblut von drei interessanten Familien zur Verfügung.



Familie 1 ist von Wirth und anderen beschrieben (Wirth, et al. 1997). Hier zeigen von 4 Geschwistern (D2, D3, D4 und D5) 3 einen haploidentischen Genotyp für die *SMN*-Region. Eine Deletion der Exons 7 und 8 des *SMN1*-Gens konnte nicht

nachgewiesen werden. Die beiden männlichen Geschwister sind gesund, während die Schwester an einer SMA erkrankt ist. Der Bruder (D3) dieser drei ist an einer SMA erkrankt, aber nicht haploidentisch mit den anderen Geschwistern. Für ihn konnte eine Deletion der Exons 7 und 8 des *SMN1*-Gens nachgewiesen werden.

Methylierung der kritischen Region in diskordanten Familien

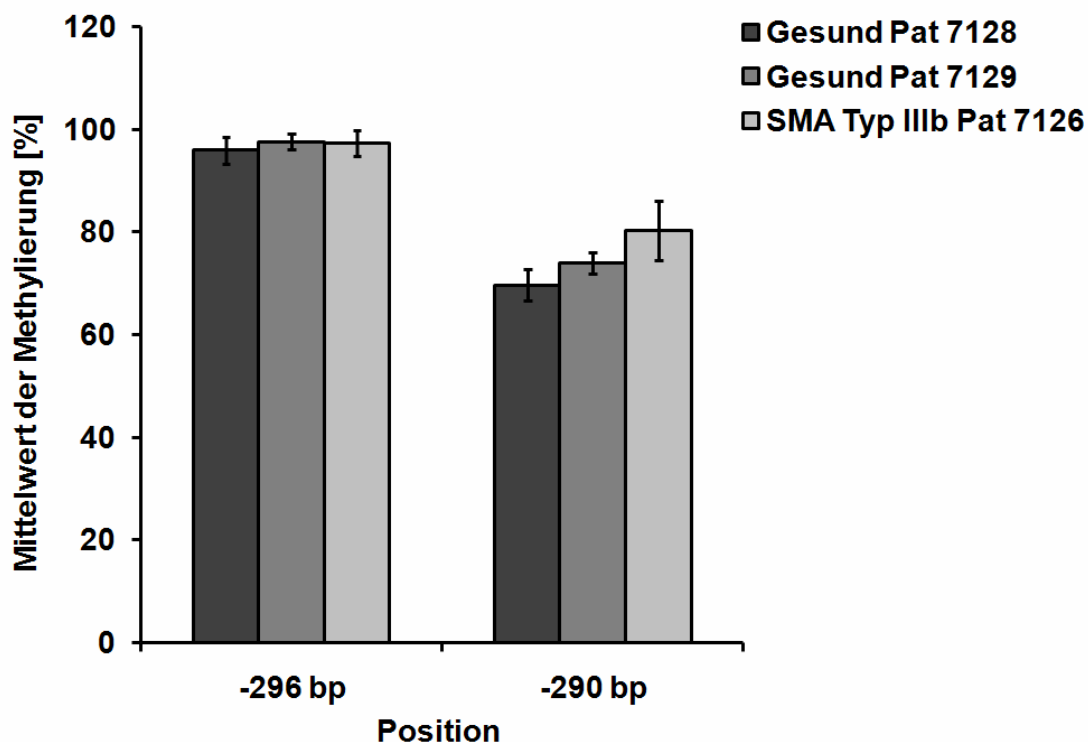


Abbildung 25: Methylierung an den Positionen -290 und -296 in *SMN*CGI2 in der ersten diskordanten Familie (n=3).

Der Vergleich der Methylierung an den Positionen -296 und -290, der die Expression des *LT-SMN2*-Transkripts und daher möglicherweise auch den Schweregrad der SMA beeinflusst, zeigte in dieser Familie keine Korrelation des diskordanten Phänotyps mit der Methylierung. Wie in Abbildung 25 zu erkennen ist, zeigen alle 3 Geschwister an Position -296 nahezu identische Methylierungswerte von 96,6% ($\pm 2,7\%$), 97,7% ($\pm 1,5\%$) und 97,3 ($\pm 2,5\%$). An Position -290 zeigte der SMA Typ IIIb Patient eine etwas stärkere Methylierung 80,3% ($\pm 5,9\%$) als die beiden nichterkrankten Personen 69,7% ($\pm 3,1\%$) bzw. 74,0% ($\pm 2,0\%$). Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

In zwei weiteren diskordanten Familien konnte das *Plastin3*-Gen als das den Schweregrad der Erkrankung modifizierende Gen identifiziert werden (Oprea, et al. 2008). Um zu überprüfen, ob möglicherweise zusätzliche Effekte durch die Methylierung der *SMN2*-Genkopien zu beobachten sind wurde in diesen Familien ebenfalls eine Analyse der Methylierung an den Positionen -296 und -290 durchgeführt. Diese Analysen zeigten jedoch keine Korrelation der Methylierung an diesen Positionen mit dem Schweregrad der Erkrankung (Abbildung 59 und Abbildung 60 im Anhang).

5.3 Expressionsanalysen nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren

In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass der experimentelle panHDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) in der Lage ist, die Stilllegung der Expression von Genen durch Methylierung zu umgehen (Jones, et al. 1998). Hier sollte nun überprüft werden, ob die HDAC-Inhibitoren Valproinsäure und Phenylbutyrat, die sich bereits in klinischen Studien zur Therapie der SMA befinden, geeignet sind, das Abschalten der Transkription vom ersten Transkriptionsstartpunkt zu umgehen, oder ob neuere potentere HDAC-Inhibitoren besser in der Lage sind, die Transkription zu reaktivieren. Um diese Frage zu adressieren wurde die Zelllinie ML17 verwendet, welche eine hohe Methylierung an den Positionen -296 und -290 zeigt, die mit niedriger Expression des *LT-SMN2*-Transkripts einhergeht (siehe

Abbildung 19). Diese Zelllinie wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener HDAC-Inhibitoren für 48h behandelt. Dabei wurden folgende HDAC-Inhibitoren aus unterschiedlichen chemischen Klassen näher untersucht: Valproinsäure und Phenylbutyrat (kurzkettige Fettsäuren), SAHA, Scriptaid und Oxamflatin (Hydroxamsäuren), Romidepsin (Depsipeptide oder FK-228) und Apicidin (zyklische Tetrapeptide) und die Benzamide M344 und MS-275.

Die Analyse der Transkriptmengen in den ML17 Zellen erfolgte zunächst mittels RT-PCR und zeigte einen Anstieg des *LT-SMN2*-Transkripts nach Behandlung mit SAHA für 48h bereits ab einer Konzentration von 5 μ M. Die Behandlung mit FK-228 bewirkte ab einer Konzentration von 200 nM eine Steigerung der *LT-SMN2*-Transkriptmenge (Abbildung 26).

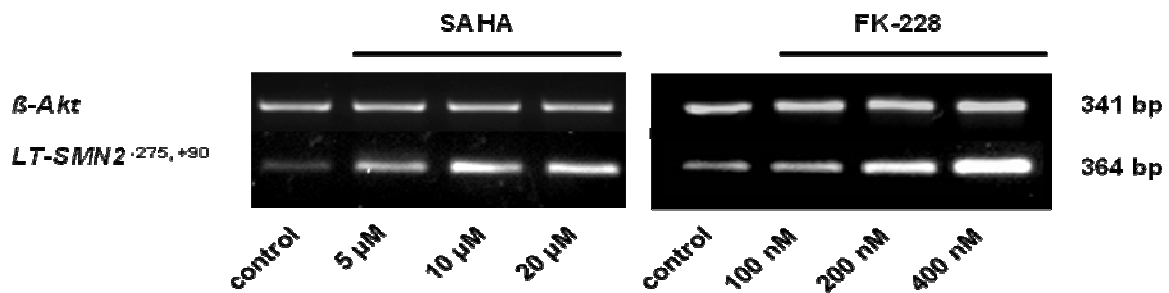


Abbildung 26: RT-PCR des *LT-SMN2*-Transkripts in der Zelllinie ML17 nach Behandlung mit SAHA bzw. FK-228 für 48h. Um gleiche cDNA Mengen sicherzustellen wurde β -Aktin als Ladekontrolle aufgetragen. Hier wurden jeweils 5 μ l des PCR-Produkts aufgetragen, die HDAC-Inhibitoren scheinen die Expression des β -Aktins hier nicht zu beeinflussen. Die Behandlung mit der Hydroxamsäure SAHA und dem zyklischen Tetrapeptid FK-228 zeigt eine deutliche Steigerung der Expression des *LT-SMN2*-Transkripts.

Da diese Vorversuche erfolgreich verliefen wurde die Behandlung der Zelllinie wiederholt und die genaue Quantifizierung der *LT-SMN2*- und *SMN2*-Transkriptmengen erfolgte mittels *real-time* PCR, dabei wurden für alle Proben gleiche RNA Mengen eingesetzt und die Ergebnisse auf β -Aktin als Haushaltsgen bezogen. Für jede Proben erfolgten die Messungen in Quadruplikaten ($n=4$). Aus den Messwerten wurden dann die Mittelwerte sowie die Standardabweichung berechnet.

Durch die Quantifizierung mittels *real-time* PCR konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit SAHA einen konzentrationsabhängigen Anstieg der *SMN2* und *LT-SMN2*-Transkriptmengen zur Folge hat. Die Menge an *LT-SMN2*-Transkript konnte durch die Behandlung mit 30 μ M etwa auf das 25fache der Kontrolle gesteigert werden. Die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge hingegen konnte auf 505% (+36% / - 34%) im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden (Abbildung 27).

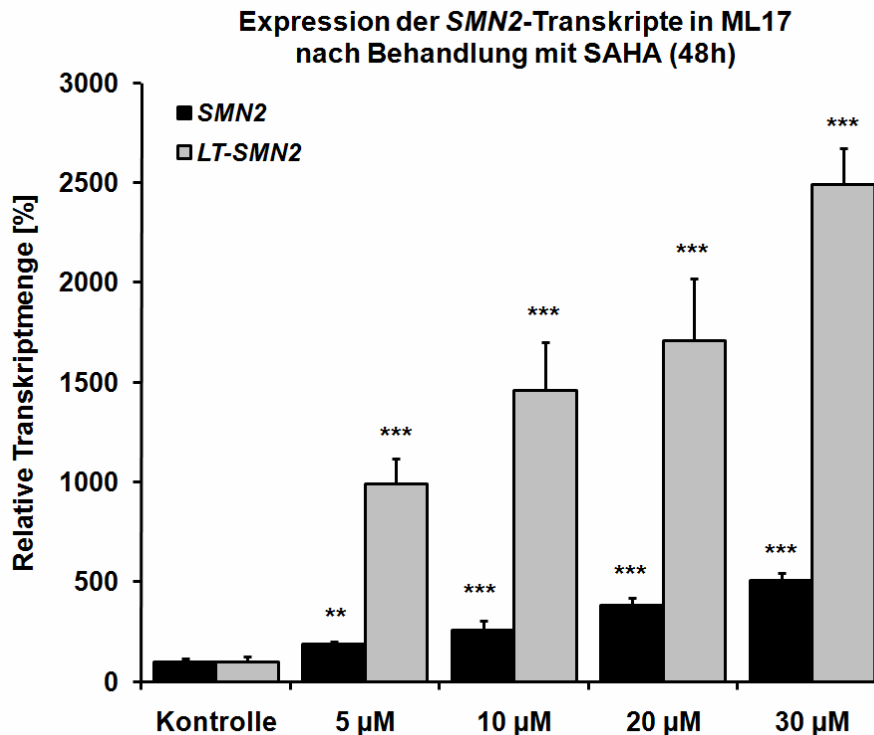


Abbildung 27: Quantifizierung der *SMN2*- und *LT-SMN2*-Transkriptmengen in ML17 nach Behandlung mit SAHA relativ zu β -Aktin. Sowohl die Gesamttranskriptmenge als auch die *LT-SMN2*-Menge zeigen einen konzentrationsabhängigen Anstieg. Die Steigerung der *LT-SMN2*-Transkriptmengen fällt deutlich höher aus als die der *SMN2*-Gesamttranskriptmenge, so ist beispielsweise bereits bei einer Konzentration von 5 μ M SAHA eine signifikante Steigerung der *LT-SMN2*-Transkriptmenge auf das 10fache der Kontrolle zu beobachten, während sich die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge nur etwa verdoppelt. Dabei wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Behandlung mit dem zyklische Tetrapeptid FK-228 führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der analysierten Transkriptmengen (Abbildung 29), jedoch konnten nicht die gleichen Effekte erzielt werden, wie durch die Behandlung mit SAHA. So führte eine Behandlung mit 200 nM des Wirkstoffs bereits nahezu zur maximalen Steigerung der Expression im Vergleich zur Kontrolle auf 855% (+118% / -104%) für die *LT-SMN2*-Transkripte und auf 323% (+34% / -31%) für die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge. Die maximale Expressionssteigerung der *SMN2*-Gesamttranskriptmenge auf 401% (+64% / -55%) konnte durch die Behandlung mit 400 nM FK-228 erreicht werden (Abbildung 28).

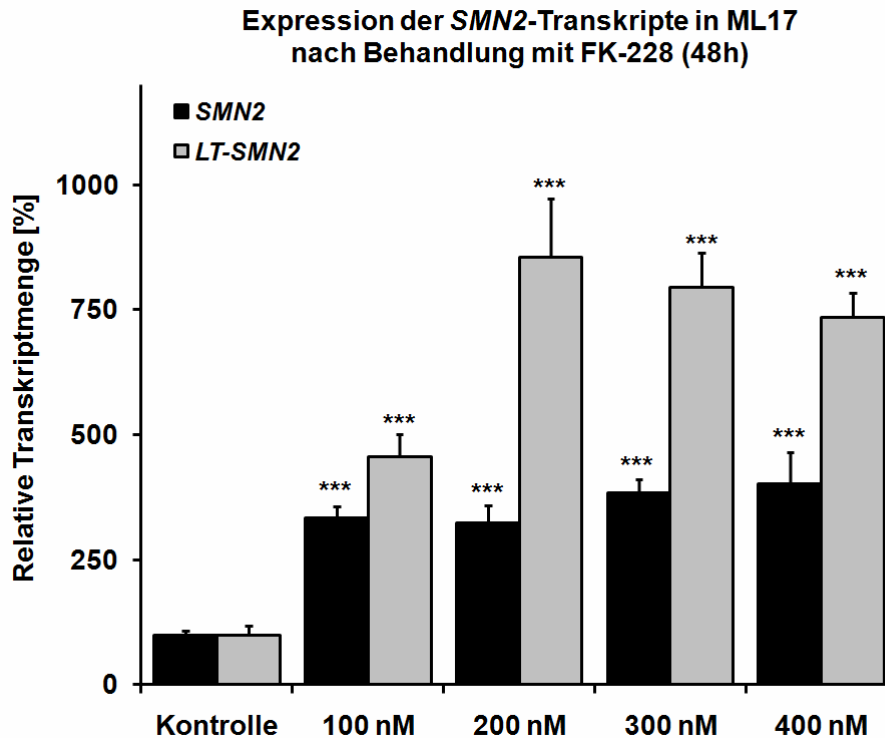


Abbildung 28: Expressionsteigerung der *LT-SMN2*- und *SMN2*-Gesamttranskriptmengen durch die Behandlung der Fibroblastenzelllinie ML17 mit FK-228 (Romidepsin) relativ zu β -Aktin. Die maximal erreichte Steigerung der *LT-SMN2*-Menge beträgt 755%, aber bereits die Behandlung mit der niedrigsten Konzentration von 100 nM bewirkte eine Steigerung der Expression dieses Transkripts auf 457% im Vergleich zur Kontrolle. Dabei wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Behandlung mit einer Konzentration von 30 μ M mit dem Benzamid M344 bewirkte nahezu eine Verzehnfachung der *LT-SMN2*-Transkriptmenge. Die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge konnte ebenfalls deutlich um 334% (+23% / -21%) gesteigert werden (Abbildung 29).

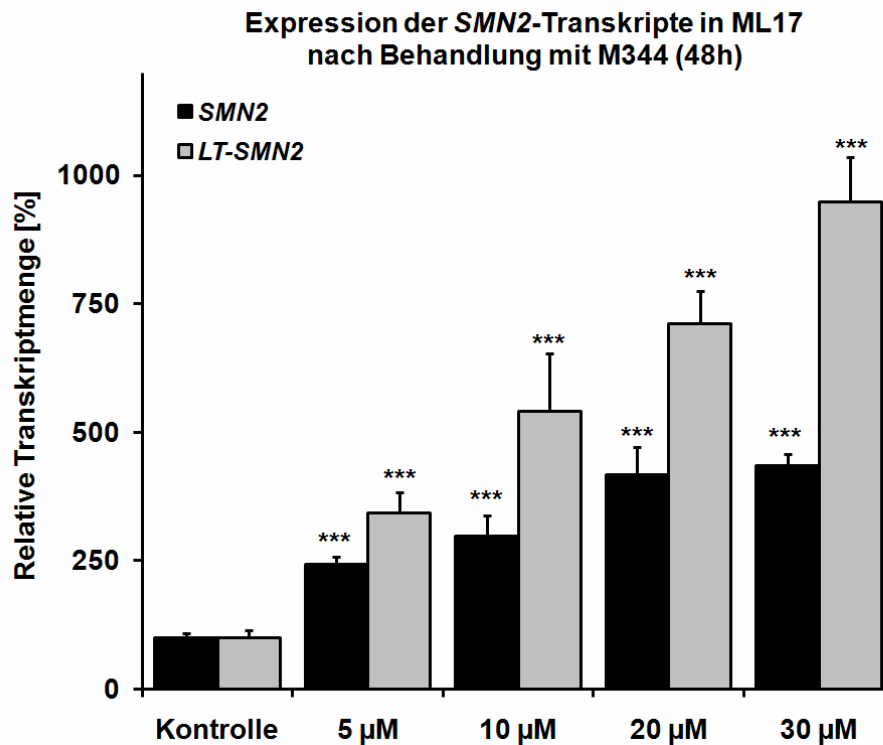


Abbildung 29: *Real-time* PCR Ergebnisse für die Zelllinie ML17 nach Behandlung mit M344 für 48h relativ zu β -Aktin. Die *LT-SMN2*-Transkriptmenge konnte durch diesen HDAC-Inhibitor deutlich auf 948% (+87% / -80%) im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden. Die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge wurde ebenfalls um 334% (+23% / -21%) erhöht. Dabei wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die Behandlung der gleichen Zelllinie mit Valproinsäure für 48h bewirkte nur bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 mM eine sehr geringe Änderung der Transkriptmengen auf 142% für die Gesamttranskriptmenge und 137% (+11% / -10%) für die *LT-SMN2*-Transkripte (Abbildung 30). Die Behandlung mit diesem HDAC-Inhibitor für 48h kann also die Abschaltung des *SMN2*-Promotors durch Methylierung offenbar nicht umgehen.

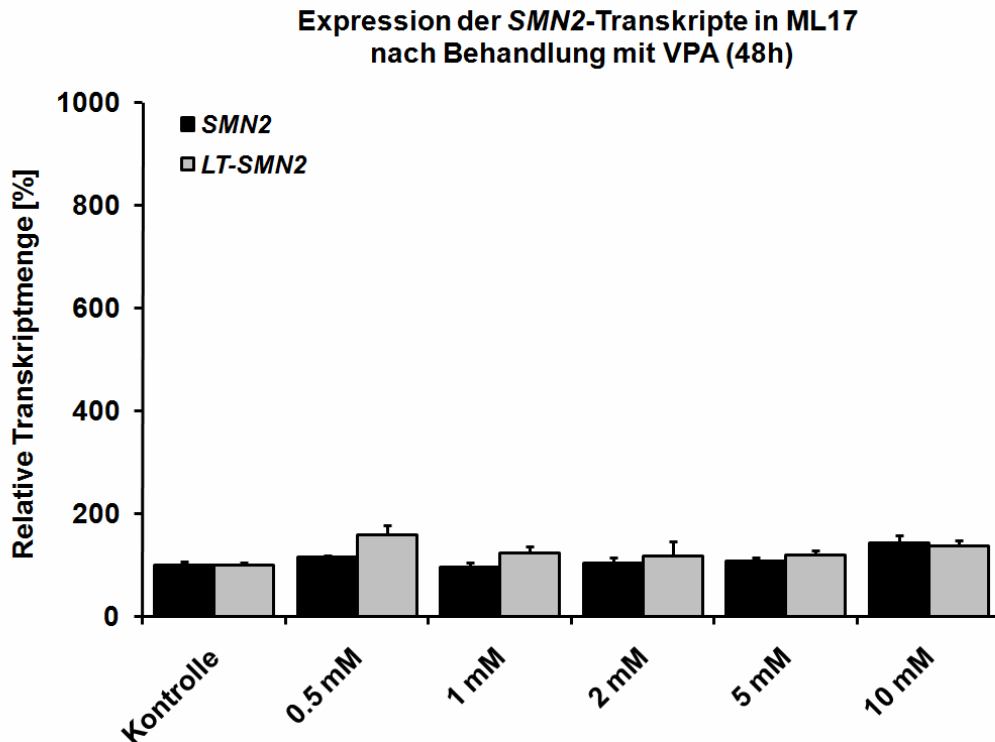


Abbildung 30: Expressionsanalyse in ML17 nach Behandlung mit Valproinsäure (VPA) für 48h relativ zu β -Aktin. Weder die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge noch die *LT-SMN2*-Transkriptmenge konnte durch diesen Wirkstoff wesentlich gesteigert werden. Bei einer Konzentration von 10 mM zeigte sich der maximale Anstieg auf 142% (+14% / -13%) für die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge bzw. 137% (+11% / -10%) für die *LT-SMN2*-Transkripte.

Die maximale Steigerung der *LT-SMN2*-Transkriptmenge durch die Behandlung mit Phenylbutyrat auf 230% (+32% / -28%) konnte bei einer Wirkstoffkonzentration von 0,2 mM erreicht werden, die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge konnte durch alle getesteten Konzentrationen dieses Wirkstoffs nicht wesentlich gesteigert werden (Abbildung 31). Phenylbutyrat zeigt also im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich keine aktivierende Wirkung.

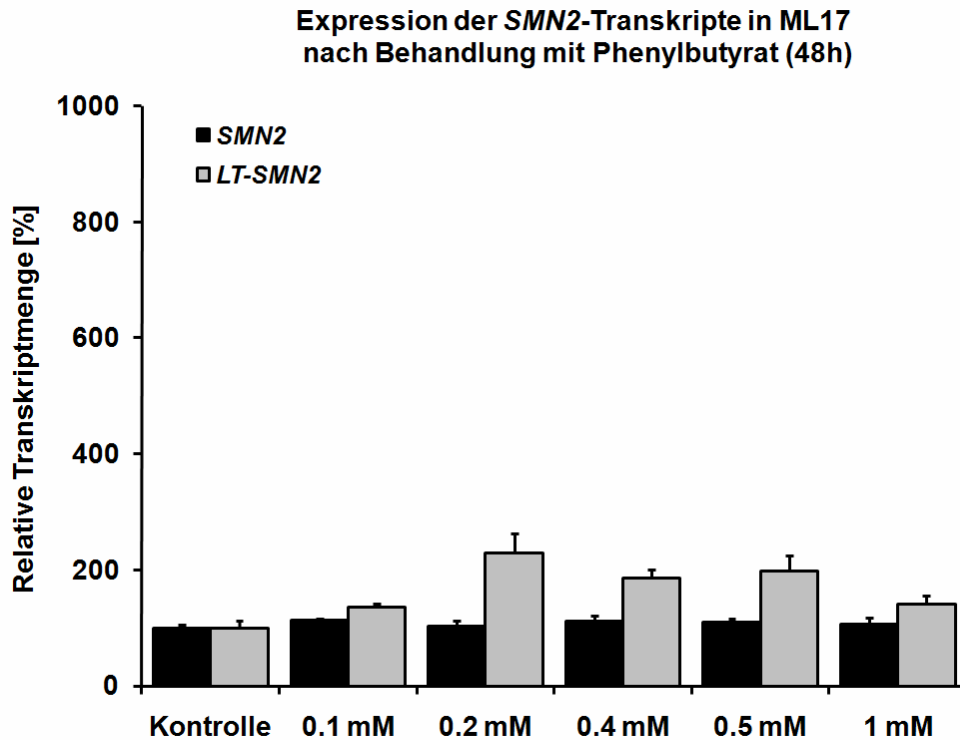


Abbildung 31: Quantifizierung der *SMN2*-Transkripte in ML17 nach Behandlung mit Phenylbutyrat für 48h. Die Behandlung mit diesem Wirkstoff führte zu keiner wesentlichen Steigerung *SMN2*-Transkriptmenge. Die maximale Steigerung der *LT-SMN2*-Transkriptmenge konnte durch die Behandlung mit 0,2 mM Phenylbutyrat erreicht werden (230% +32% / -28%) im Vergleich zur Kontrolle.

Ähnliche Ergebnisse zeigte die Behandlung mit MS-275 (Abbildung 31) bzw. Phenylbutyrat (Abbildung 32). Durch die Behandlung mit Konzentrationen von 30 μ M und 40 μ M MS-275 konnte die Expression des *LT-SMN2*-Transkripts nur moderat auf 266% (+16% / -15%) bzw. 220% (+10% / -9%) im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden. Die Expressionssteigerung der *SMN2*-Transkripte fiel wie erwartet mit 149% (+19% / -17%) bzw. 160% (+11% / -10%) noch geringer aus. Bei niedrigen Konzentrationen hingegen ist MS-275 nicht in der Lage die Expression der *SMN2*-Transkripte in den ML17 Zellen deutlich zu steigern.

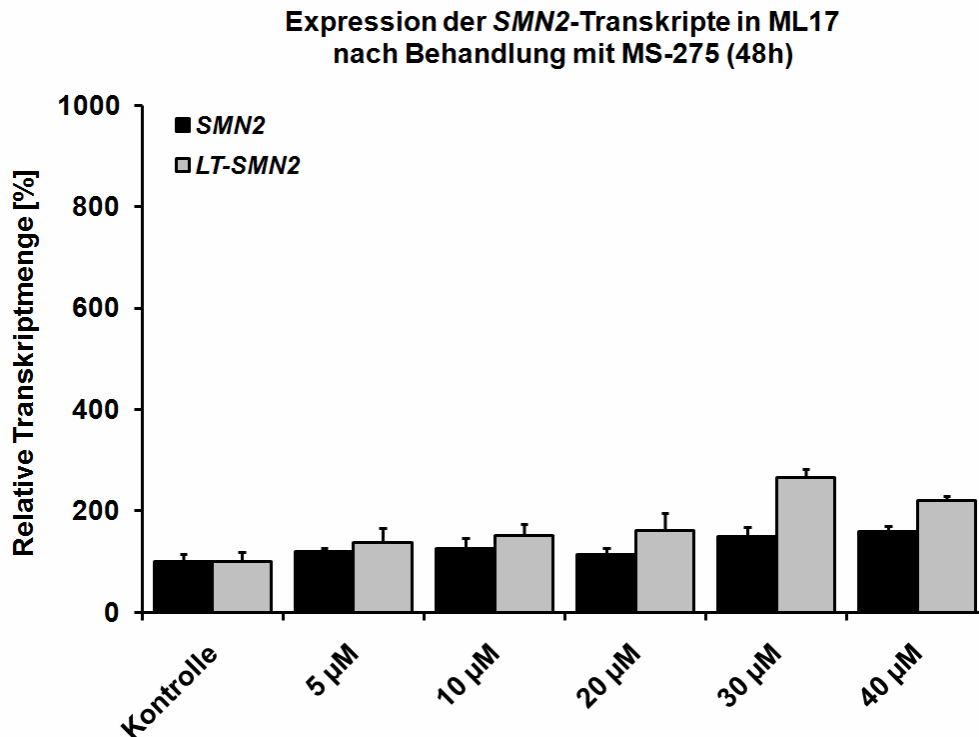


Abbildung 32: Expressionsanalyse in ML17 nach Behandlung mit MS-275. Diese Substanz führt nur bei hohen Wirkstoffkonzentrationen zu einem im Vergleich mit den anderen untersuchten Substanzen moderaten Anstieg der *SMN2*-Transkriptmengen. Die maximale Steigerung der *LT-SMN2*-Menge auf 266% (+16% / -15%) konnte durch die Behandlung mit 30 µM MS-275 erreicht werden. Die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge konnte bei dieser Wirkstoffkonzentration nur leicht auf 149% (+19% / -17%) erhöht werden.

Die Behandlung mit den weiteren getesteten potenteren panHDAC-Inhibitoren zeigte erneut eine deutliche konzentrationsabhängige Steigerung der *SMN*-Transkripte (siehe Tabelle 12 und Abbildung 63, Abbildung 64 im Anhang). Die Behandlung mit der kurzkettigen Fettsäure Scriptaid steigerte die *LT-SMN2* Transkriptmenge um 1166% (+52% / -50%), während die Gesamttranskriptmenge nur auf 228% (+30% / -27%) im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden konnte. Die Behandlung mit der höchsten Oxamflatinkonzentration von 30 µM zeigte die höchste gemessene Steigerung des *LT-SMN2*-Transkripts auf das 29fache der Kontrolle, wobei die Gesamttranskriptmenge auch deutlich auf 591% (+73% / -65%) im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden konnte. Das zyklische Tetrapeptid Apicidin war weniger effektiv als die beiden zuvor beschriebenen Substanzen und konnte die *LT-SMN2*-Transkriptmenge jedoch bei einer Wirkstoffkonzentration von 300 nM auch auf 715% (+99% / -87%) steigern, die *SMN2*-Transkriptmenge nur auf 188% (+18% / -17%).

Tabelle 12: Zusammenfassung der *real-time* PCR Ergebnisse der Zelllinie ML17 nach Behandlung mit verschiedenen HDAC-Inhibitoren relativ zu β -Aktin nach Substanzklassen sortiert. Angegeben sind die Wirkstoffkonzentrationen, welche zum höchsten Anstieg der Transkriptmenge führen und die erreichte Steigerung der Transkriptmenge, sowie die niedrigste effektive Wirkstoffkonzentration und die bei dieser Konzentration gemessene Transkriptmenge.

Wirkstoff	Konz.	Maximale Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle [%]	Geringste Effektive Konz.	Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle [%]
VPA	10 mM	<i>LT-SMN2</i> 137 (+11 / -10)	0,5 mM	<i>LT-SMN2</i> 159 (+17 / -16)
		<i>SMN2</i> 142 (+14 / -13)		<i>SMN2</i> 115 (+2 / -2)
Phenylbutyrat	0,2 mM	<i>LT-SMN2</i> 230 (+32 / -28)	0,1 mM	<i>LT-SMN2</i> 136 (+6 / -6)
		<i>SMN2</i> 103 (+10 / -9)		<i>SMN2</i> 113 (+2 / -2)
SAHA	30 μ M	<i>LT-SMN2</i> 2489 (+184 / -172)	5 μ M	<i>LT-SMN2</i> 991 (+127 / -112)
		<i>SMN2</i> 505 (+36 / -34)		<i>SMN2</i> 187 (+14 / -13)
Scriptaid	20 μ M	<i>LT-SMN2</i> 1266 (+52 / -50)	5 μ M	<i>LT-SMN2</i> 448 (+30 / -29)
		<i>SMN2</i> 228 (+30 / -27)		<i>SMN2</i> 116 (+8 / -7)
Oxamflatin	30 μ M	<i>LT-SMN2</i> 2909 (+290 / -264)	5 μ M	<i>LT-SMN2</i> 574 (+38 / -36)
		<i>SMN2</i> 591 (+73 / -65)		<i>SMN2</i> 175 (+17 / -16)
FK-228	200 nM	<i>LT-SMN2</i> 855 (+118 / -103)	50 nM	<i>LT-SMN2</i> 353 (+48 / -42)
		<i>SMN2</i> 324 (+34 / -31)		<i>SMN2</i> 324 (+34 / -31)
Apicidin	300 nM	<i>LT-SMN2</i> 715 (+99 / 87)	50 nM	<i>LT-SMN2</i> 172 (+23 / -20)
		<i>SMN2</i> 188 (+18 / -17)		<i>SMN2</i> 120 (+13 / -12)
M344	30 μ M	<i>LT-SMN2</i> 948 (+87 / -80)	5 μ M	<i>LT-SMN2</i> 343 (+40 / -36)
		<i>SMN2</i> 434 (+23 / -21)		<i>SMN2</i> 244 (+14 / -13)
MS-275	30 μ M	<i>LT-SMN2</i> 266 (+16 / -15)	5 μ M	<i>LT-SMN2</i> 139 (+27 / -23)
		<i>SMN2</i> 149 (+19 / -17)		<i>SMN2</i> 119 (+7 / -7)

Es zeigte sich also, dass sechs der neun getesteten Wirkstoffe in der Lage sind, die *LT-SMN2*-Transkriptmenge konzentrationsabhängig drastisch zu erhöhen. Dies zeigt, dass HDAC-Inhibitoren die Hemmung der *LT-SMN2*-Expression, die durch DNA-Methylierung vermittelt wird, aufheben können. In allen Analysen zeigte sich, dass die konzentrationsabhängige Induktion der *LT-SMN2*-Expression mit einer Steigerung der *SMN2*-Gesamttranskriptmenge einhergeht. Die Behandlung mit 30 μ M SAHA führte beispielsweise zu einer ~25fachen Induktion des *LT-SMN2*-Transkripts und einer 5 fachen Induktion der *SMN2*-Gesamttranskription. Bei diesen HDAC-Inhibitoren handelt es sich jedoch um panHDAC-Inhibitoren die wie in (Hahnen, et al. 2008) beschrieben in der Lage sind, in *in vitro* Experimenten die

gesamte HDAC Aktivität zu hemmen. Daher untersuchten wir auch die Isoenzym selektiven HDAC-Inhibitoren MS-275, VPA, und Phenylbutyrat, von denen sich die letzten beiden in klinischer Testung für die SMA-Therapie befinden, auf ihre Fähigkeit die *LT-SMN2*-Transkription zu steigern. Interessanterweise waren weder das Benzamid MS-275 noch die kurzkettigen Fettsäuren VPA und Phenylbutyrat in der Lage die *LT-SMN2*-Transkriptmengen in den untersuchten Konzentrationen und nach einer Behandlungsdauer von 48h deutlich zu steigern. Selbst hohe Wirkstoffkonzentrationen zeigten keinen Effekt was verdeutlicht, dass diese Isoenzym-selektiven HDAC-Inhibitoren in diesem experimentellen System nicht in der Lage sind die Hemmung der Expression durch DNA-Methylierung zu überwinden.

5.4 Analyse der *SMN*-Expression in OHSCs nach der Behandlung mit HDAC-Inhibitoren

Um diese Ergebnisse in neuroektodermalem Gewebe zu bestätigen führten wir anschließend Analysen mit humanen hippokampalen Hirnschnitten (*organotypical human brain slice cultures*, OHSCs) durch. Diese Hirnschnitte stammen wie beschrieben von epilepsiechirurgischen Eingriffen (6 Patienten) die an der Neurochirurgischen Klinik der Universität Erlangen durchgeführt wurden (Dr. Ilker Eyüpoglu, Dr. Johann Romstöck) und wurden im Lehrstuhl für Neuropathologie der Universität Erlangen (Prof. Dr. Ingmar Blümcke) aufbereitet und in Kultur genommen. Die Quantifizierung der Transkriptmengen in der aus den Hirnschnitten isolierten RNA erfolgte erneut mittels *real-time* PCR. Da es sich bei diesen Patienten nicht um SMA-Patienten handelte und keine Bestimmung der *SMN1*- bzw. *SMN2*-Kopienzahl erfolgte, können hier *SMN1*- und *SMN2*-Transkripte nicht unterschieden werden, da die Promotorregionen der beiden Gene, wie beschrieben, nahezu identisch sind.

Die Behandlung der OHSCs von Patient P5 mit SAHA bewirkte eine Induktion der *SMN*-Expression. Eine Wirkstoffkonzentration von 64 μ M SAHA führt zu einer signifikanten Steigerung der *LT-SMN*-Transkriptmenge (469% +72% / -62%) in den untersuchten Proben (Abbildung 33) die *SMN*-Gesamttranskriptmenge stieg bei dieser Konzentration auf 241% (+33% / -29%). Während die Behandlung mit VPA nur eine moderate aber signifikante Steigerung der Expression der *LT-SMN*-Expression

bewirkte (138% +12 / -11%) konnte die *SMN*-Gesamttranskriptmenge signifikant auf 206% (+16% / -15%) gesteigert werden.

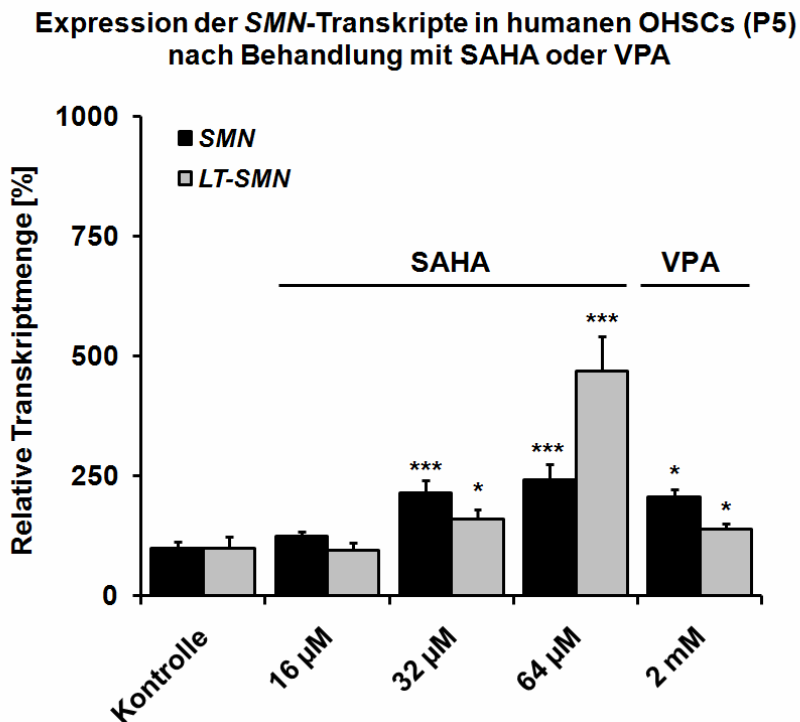


Abbildung 33: Expression der untersuchten *SMN*-Transkripte relativ zu β -Aktin in Hirnschnitten aus Patient P5, die mit SAHA oder VPA behandelt wurden. Die Behandlung mit 64 μ M SAHA für 48h führt zu einer signifikanten Steigerung der *LT-SMN* Transkriptmenge (469% +72% / -62%). Dabei wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Auch die Behandlung der OHSCs von Patient P7 mit SAHA bewirkte eine Induktion der *SMN*-Expression. Eine Wirkstoffkonzentration von 40 μ M SAHA führt zu einer signifikanten Steigerung der *LT-SMN*-Transkriptmenge (807% +166% / -138%) in den untersuchten Proben (Abbildung 34) die *SMN*-Gesamttranskriptmenge stieg bei dieser Konzentration auf 310% (+16% / -15%). Die Behandlung mit VPA hingegen bewirkte keine Steigerung der Expression der *LT-SMN*-Expression (94% +13 / -11%) hingegen konnte die *SMN*-Gesamttranskriptmenge signifikant auf 183% (+10% / -10%) gesteigert werden.

**Expression der *SMN*-Transkripte in humanen OHSCs (P7)
nach Behandlung mit SAHA oder VPA**

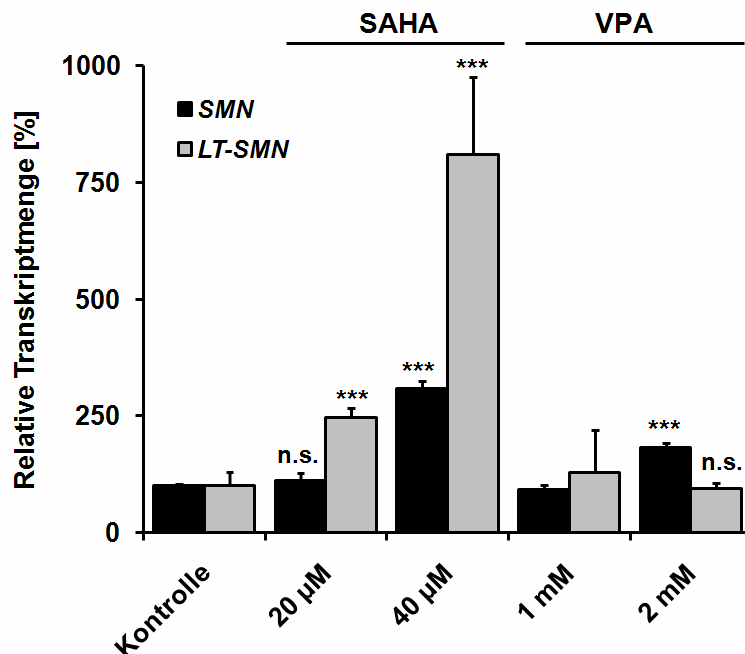


Abbildung 34: Expression der untersuchten *SMN*-Transkripte relativ zu β -Aktin in Hirnschnitten aus Patient P7, die mit SAHA oder VPA behandelt wurden. Die Behandlung mit 40 μ M SAHA führt zu einer deutlichen Steigerung der *LT-SMN*- (810% +166% / -138%) und *SMN*-Transkriptmenge (310% +16% / -15%). Die Behandlung mit 2 mM VPA hingegen erhöht die *SMN* Gesamt-transkriptmenge signifikant auf 182% (\pm 10%). Ein Effekt auf die *LT-SMN*-Transkription war durch die Behandlung mit VPA nicht feststellbar. Dabei wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Durch die Behandlung mit M344 zeigte sich in den OHSCs von Patient P8 ein konzentrationsabhängiger Anstieg der *SMN*-Gesamttranskriptmenge auf bis zu 258% (+43% / -37%) bei einer Konzentration von 32 μ M (Abbildung 35). Die höchste Steigerung der *LT-SMN*-Transkription konnte durch die Behandlung mit 16 μ M M344 erreicht werden (1234% +143% / -128%).

**Expression der *SMN*-Transkripte in humanen OHSCs (P8)
nach Behandlung mit M344 (48h)**

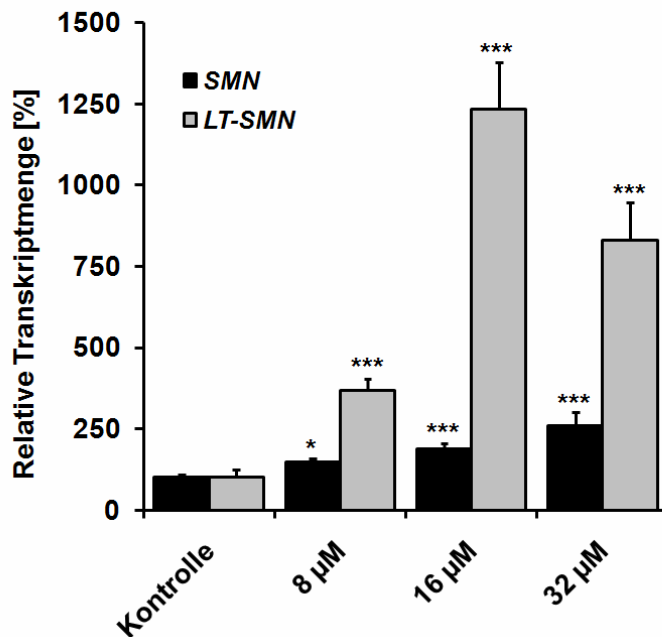


Abbildung 35: Expression der *SMN*-Transkripte in OHSCs von Patient P8 nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen M344. Die Behandlung bewirkt einen konzentrationsabhängigen Anstieg der *SMN*-Gesamttranskriptmenge auf 258% (+43% / -37%). Die höchste Steigerung der *LT-SMN*-Transkription konnte durch die Behandlung mit 16 µM M344 erreicht werden (1234% +143% / -128%).

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen in den Die Behandlung der Hirnschnitte mit SAHA oder M344 führte zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der *LT-SMN*-Transkripte (Abbildung 33, 34 und 35 sowie Tabelle 12) während die Behandlung mit VPA erneut keinen oder nur eine moderate Steigerung der *LT-SMN*-Transkription zur Folge hatte. Die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge konnte durch VPA in den OHSCs der Patienten P5 und P7 dennoch signifikant gesteigert werden. Die konzentrationsabhängige Induktion der *SMN*-Transkription die in den OHSCs von Patient P8 durch Behandlung mit M344 beobachtet wurde, konnte auf Proteinebene bestätigt werden (siehe Abbildung 65 im Anhang). Die Ergebnisse für die weiteren untersuchten OHSCs der Patienten H5, H6 und P9 befinden sich ebenfalls im Anhang (Abbildungen 69,70 und 71)

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den OHSCs. Dargestellt ist jeweils die Wirkstoffkonzentration, welche die maximale Steigerung der *LT-SMN2*-Expression zur Folge hatte. (Außer H5, da hier für alle VPA Konzentrationen eine Reduktion der *LT-SMN2*-Transkriptmenge zu beobachten war).

OHSC	Wirkstoff	Wirkstoff-konzentration	Maximale Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle [%]
H5	VPA	0,4 mM	<i>LT-SMN</i> 85 (+4 / -4)
			<i>SMN</i> 143 (+14 / -13)
H6	VPA	1,2 mM	<i>LT-SMN</i> 174 (+30 / -26)
			<i>SMN</i> 94 (+13 / -11)
P5	SAHA	64 µM	<i>LT-SMN</i> 469 (+72 / -62)
			<i>SMN</i> 242 (+33 / -29)
P5	VPA	2 mM	<i>LT-SMN</i> 139 (+12 / -11)
			<i>SMN</i> 206 (+16 / -15)
P7	SAHA	40 µM	<i>LT-SMN</i> 810 (+166 / -138)
			<i>SMN</i> 310 (+16 / -15)
P7	VPA	2 mM	<i>LT-SMN</i> 94 (+13 / -11)
			<i>SMN</i> 183 (+10 / -10)
P8	M344	16 µM	<i>LT-SMN</i> 1234 (+143 / -128)
			<i>SMN</i> 189 (+17 / -15)
P9	VPA	2 mM	<i>LT-SMN</i> 307 (+124 / -88)
			<i>SMN</i> 139 (+17 / -15)

5.5 HDAC-Inhibitoren führen nicht zu einer Demethylierung des *SMN2*-Promotors

Der Mechanismus, durch den die panHDAC-Inhibitoren wie SAHA und FK-228 die Hemmung der Expression des *LT-SMN2*-Transkripts überwinden können, ist unbekannt. Für die HDAC-Inhibitoren TSA (Trichostatin A) und VPA konnte jedoch gezeigt werden, dass sie in *in vitro* Experimenten über genspezifische demethylierende Eigenschaften verfügen (Detich, et al. 2003). Diese genspezifischen demethylierenden Eigenschaften konnten für MS-275, VPA und TSA in *in vivo* Experimenten bestätigt werden (Dong, et al. 2007). Daher sollte überprüft werden, ob VPA und Phenylbutyrat, die nur eine geringe Steigerung *LT-SMN2*-Expression

bewirken konnten, aber insbesondere auch SAHA in der Lage sind, die Methylierung des ^{SMN2}CGI 2 in den ML17 Zellen zu verringern. Außerdem wurde die Auswirkung von Phenylbutyrat und SAHA auf die Methylierung des *SMN2*-Promotors untersucht.

**LT-SMN2-Expression in ML17
nach Behandlung mit Zebularine (48h)**

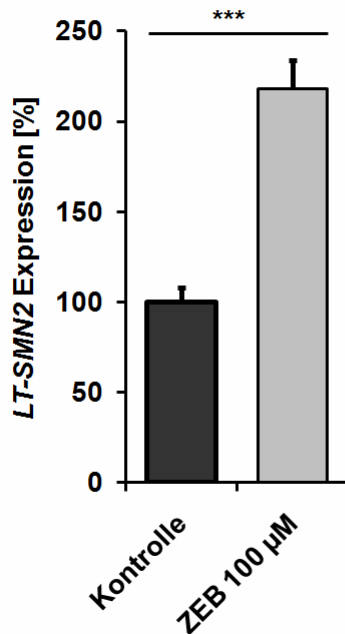


Abbildung 36: *real-time* PCR des *LT-SMN2*-Transkripts in ML17 nach Behandlung mit Zebularin. Dieser demethylierende Wirkstoff führt nach 48h zu einer signifikanten Steigerung der Expression ($p < 0,001$) vom 1. Transkriptionsstartpunkt (218% +16% / -15%).

Als Positivkontrolle diente der DNA-Methyltransferase-Inhibitor Zebularin. Die Behandlung der Zelllinie ML17 mit diesem demethylierenden Wirkstoff für 48h führt zu einer signifikanten Steigerung der *LT-SMN2*-Transkriptmenge (Abbildung 36) sowie einer signifikanten Demethylierung des ^{SMN2}CGI2 (Abbildung 69). Unterschiede in der Methylierung sind im Folgenden immer als Prozentpunkte angegeben. Die Analyse der Methylierung im ^{SMN2}CGI2 nach 48h Behandlungsdauer zeigte im Vergleich zur Kontrolle für die HDAC-Inhibitoren VPA, Phenylbutyrat und SAHA nur an wenigen CpG-Dinukleotiden signifikante Veränderung. So zeigte sich nach der Behandlung mit VPA an Positionen -330 10,1% weniger Methylierung als in der Kontrolle ($p = 0,0189$). An Position -290 beträgt der Unterschied -9,6% ($p = 0,0415$) und -11% ($p = 0,0025$) an Position -285 nach der Behandlung mit VPA. Ähnlich die Ergebnisse für die Behandlung mit Phenylbutyrat hier zeigten sich folgende Methylierungsunterschiede zur Kontrolle: +6,3% ($p = 0,0091$) an Position -376, -8,3%

an Position -330 ($p=0,0246$), -14,1% ($p=0,0391$) an Position -290 und schließlich 7,1% an Position -288 ($p=0,0318$). Nach Behandlung der ML17 Zellen mit SAHA konnte an Position -330 eine signifikante Reduktion ($p=0,0165$) der Methylierung um 8,7% gemessen werden (Abbildung 37). Das CpG-Dinukleotid an Position -312 zeigte nach Behandlung mit SAHA 8,2% weniger Methylierung als die Kontrolle ($p=0,0012$) und an Position -285 konnten 18,5% weniger Methylierung festgestellt werden ($p=0,0035$).

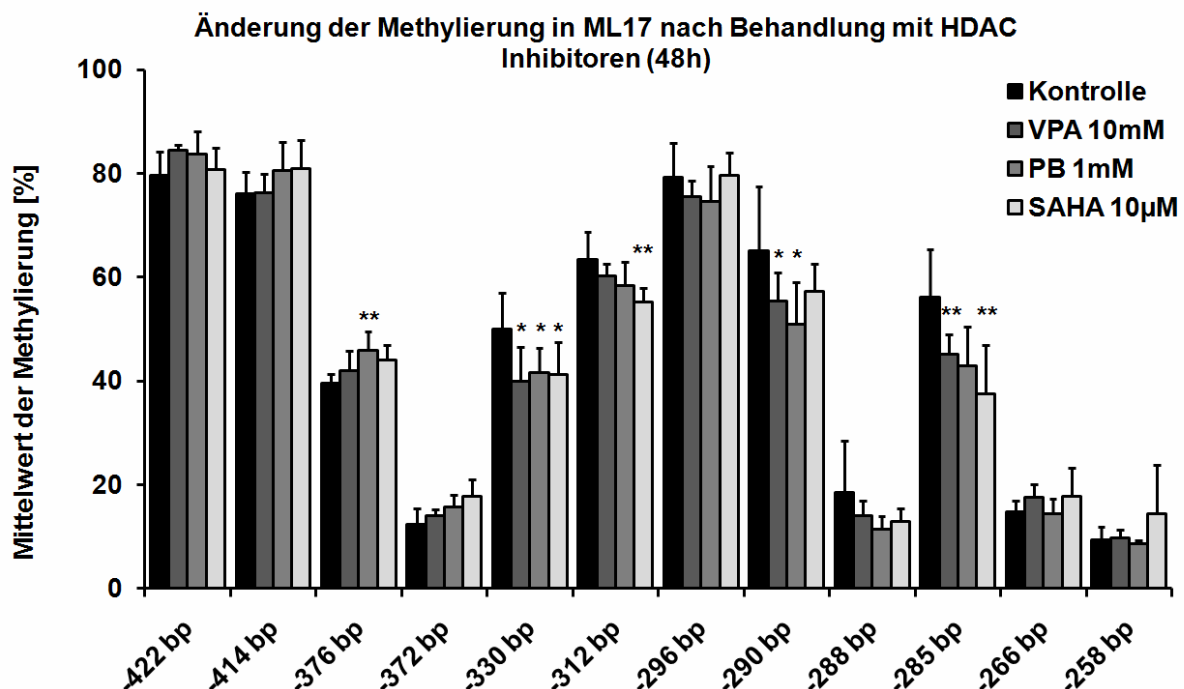


Abbildung 37: Vergleich des ^{SMN2}CGI2 Methylierungsmusters in der SMA Fibroblastenzelllinie ML17 nach Behandlung mit Valproinsäure, Phenylbutyrat oder SAHA für 48h. Die Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren zeigt nur geringe Veränderung der Mittelwerte der Methylierung von 47,0% in der Kontrolle auf 44,5% (VPA), 44,1% (PB) und 45,0% (SAHA). Für einige CpG-Dinukleotide zeigten sich jedoch signifikante Änderungen durch die Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren. Es wurden bei Methylierungswerten die sich um mehr als 5 Prozentpunkte von der Kontrolle unterscheiden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Behandlung mit Zebularin für 48h hingegen bewirkte eine Reduktion der DNA-Methylierung gegenüber der Kontrolle um durchschnittlich 10% für das gesamte ^{SMN2}CGI2 (Abbildung 69), dabei konnte für 9 der 12 CpG-Dinukleotide eine signifikante Reduktion der Methylierung gemessen werden. Insbesondere an den Positionen -296 und -290 konnte eine starke Abnahme der Methylierung um 14,5

($p < 0,01$) bzw. 20,9% ($p < 0,001$) festgestellt werden, die mit einer signifikanten Steigerung der *LT-SMN2*-Transkriptmenge einhergeht (vergl. Abbildung 36). Auch für den panHDAC-Inhibitor SAHA, der in der Lage ist die Expression des *LT-SMN2* deutlich zu steigern, war nur ein leichter demethylierender Effekt unter den verwendeten Versuchsbedingungen zu finden, der die massive Steigerung der *LT-SMN2*-Expression durch SAHA nicht erklären kann. SAHA scheint also die Hemmung der Expression vom 1. Transkriptionsstartpunkt des *SMN2*-Gens durch Methylierung zu umgehen und nicht die Methylierung selbst zu verringern (Abbildung 37).

5.6 Das Methylierungsmuster des *SMN2*-Transgens in Mäusen unterscheidet sich vom dem des humanen *SMN2*-Gens

Die SMA ist wie eingangs erwähnt eine neurodegenerative Erkrankung, in deren Krankheitsverlauf es zum Untergang der α -Motoneuronen des Rückenmarks kommt. Die in der Zellkultur verwendeten Fibroblasten sowie die untersuchten Blutproben stellen nur ein Modell zur Untersuchung der Krankheit dar. Die Ergebnisse der Expressions- und Methylierungsuntersuchungen in diesen Proben lässt nur bedingt Rückschlüsse auf die Bedeutung im eigentlichen neuronalen Zielgewebe zu. Da diese neuronalen Gewebe beim Menschen nicht für Untersuchungen zur Verfügung stehen, sollte im SMA-Mausmodell untersucht werden, ob sich das Methylierungsmuster des humanen *SMN2*-Gens in den verschiedenen murinen neuronalen Geweben unterscheidet und ob diese Unterschiede mit Veränderungen in der Expression des *LT-SMN2* einhergehen. Zunächst sollte jedoch festgestellt werden, ob das Methylierungsprofil im SMA-Mausmodell mit dem Methylierungsprofil in humanen Fibroblasten bzw. dem im Blut übereinstimmt. Hierzu wurde DNA aus dem Hirn von transgenen Mäusen (Burghes-Mäuse) isoliert, die zwei Kopien des humanen *SMN2*-Transgens und eine Kopie des murinen *Smn*-Gens tragen und daher keine SMA zeigen ($Smn^{+/-}$, $SMN2^{tg/tg}$). Dieses murine *Smn*-Gen beeinflusst die Analyse der Methylierung des *SMN2*-Transgens nicht, da die gewählten Primer spezifisch für das *SMN2*-Gen sind und keine Sequenzen des *Smn*-Gens amplifizieren. Außerdem wurde DNA aus murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) isoliert die aus einem homozygoten SMA Embryo ($Smn^{-/-}$, $SMN2^{tg/tg}$) stammen.

Die Analyse zeigte für alle drei untersuchten Proben für das $SMN2$ CGI 2 ähnliche Methylierungsprofile (Abbildung 38). Der Vergleich der einzelnen CpG-Dinukleotide zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Proben. Der Vergleich der Methylierung im $SMN2$ CGI 2 des Transgens mit dem in den Blutproben der SMA-Patienten zeigt jedoch eine deutliche Reduktion der Methylierung in diesem Bereich des SMN -Promotors in den transgenen Tieren bzw. Zellen. Da die DNA-Methylierung wie gezeigt Einfluss auf die Expression des $LT-SMN2$ hat, ist es möglich, dass die Transgenen $SMN2$ -Kopien auf die pharmakologische Induktion dieses Gens anders reagieren als die $SMN2$ -Kopien im Menschen. Hier sollte daher das $SMN2$ -Transgen in den Burghes-Mäusen näher charakterisiert werden und die Auswirkung der Behandlung mit SAHA auf die Methylierung untersucht werden.

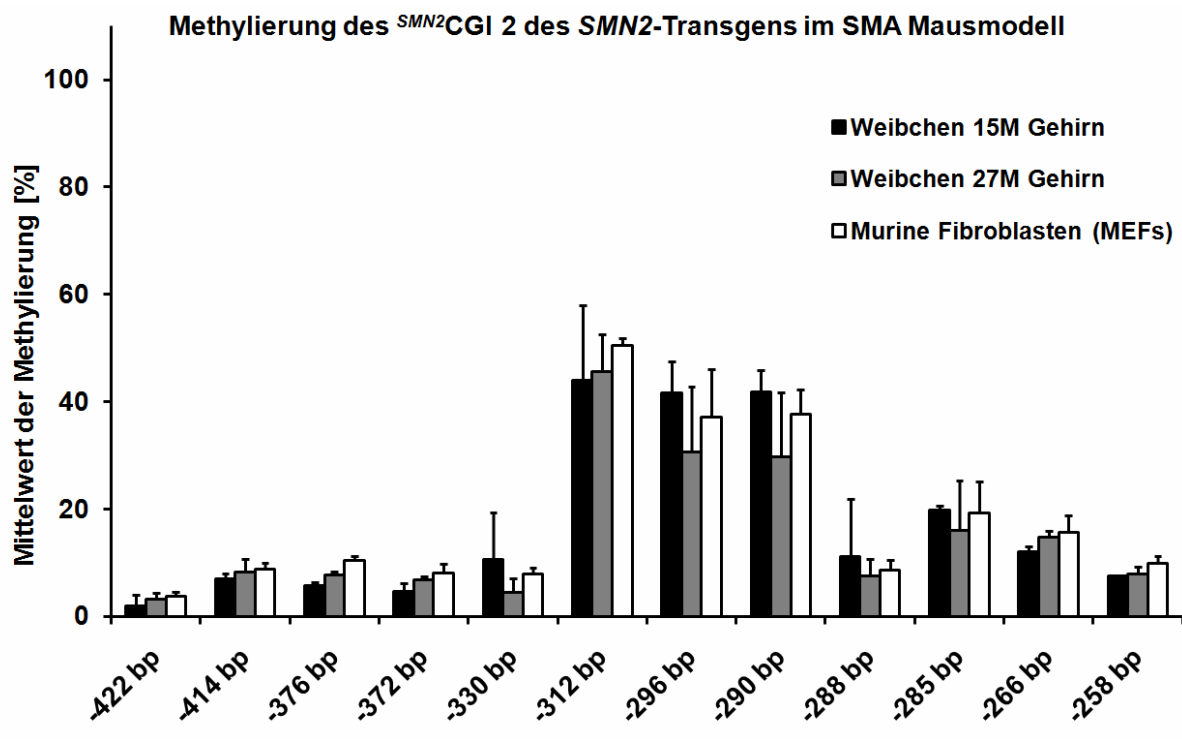


Abbildung 38: Analyse der Methylierung im $SMN2$ CGI 2 in Hirnproben heterozygoter Tiere (Burghes Mäuse $Smn^{+/-}$, $SMN2^{tg/tg}$), sowie in Fibroblastenzellen aus homozygoten SMA-Tieren ($Smn^{-/-}$, $SMN2^{tg/tg}$) des gleichen SMA-Mausmodells. Die Analysen zeigen geringere Methylierungswerte für alle untersuchten CpG-Dinukleotide als in den humanen Blutproben. Es konnten keine signifikanten Methylierungsunterschiede zwischen den Hirnproben und den Fibroblastenzellen festgestellt werden.

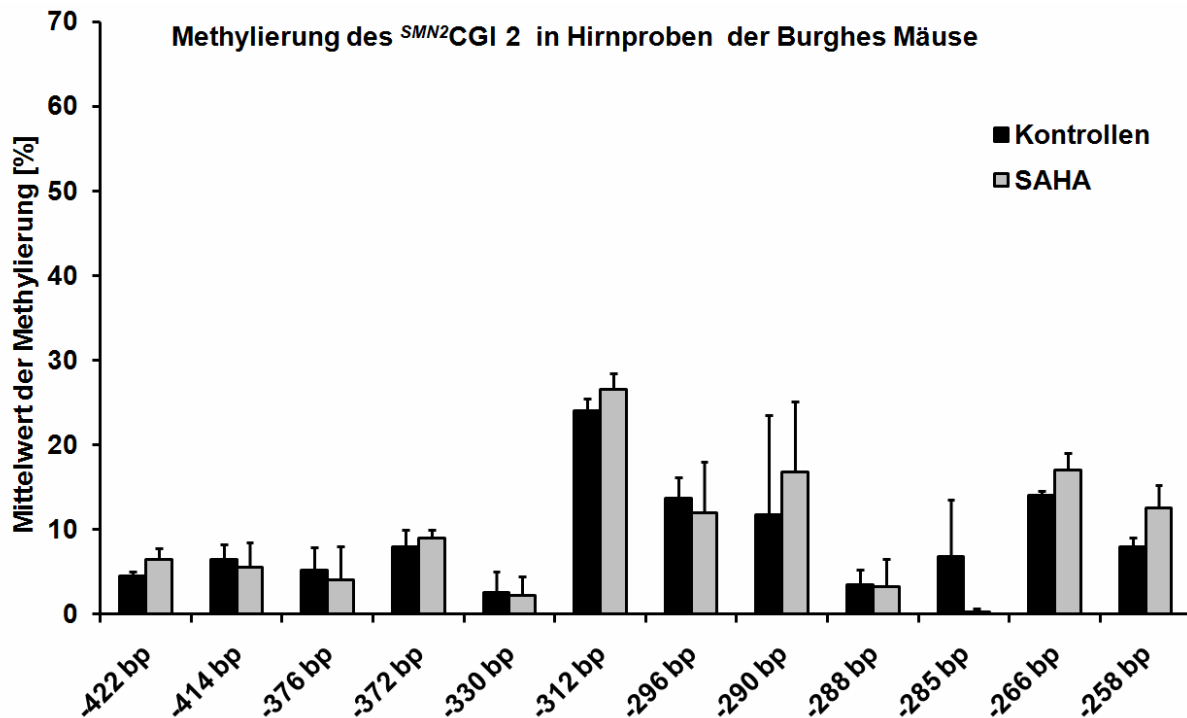


Abbildung 39: Vergleich der Methylierung des $SMN2$ CGI 2 in Hirnproben von unbehandelten heterozygoten Kontrollen (n=4) mit dem Genotyp: $Smn^{+/-}$, $SMN2^{tg/tg}$ und Tieren des gleichen Genotyps, die mit SAHA behandelt wurden (n=4). Der Vergleich der Mittelwerte der Methylierung zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten Tieren und Kontrollen.

Wie in Abschnitt 5.3 beschrieben sind panHDAC-Inhibitoren wie SAHA in der Lage, die Expression des *LT-SMN2*-Transkripts deutlich zu steigern. In den humanen Fibroblastenzelllinien konnte durch die Behandlung mit SAHA geringe Änderungen der Methylierung des *SMN2*-Gens erzielt werden. Um zu überprüfen, ob dieser Wirkstoff in *in vivo* Experimenten bei längerer Behandlungsdauer der Tiere demethylierende Eigenschaften besitzt, wurde die Methylierung des *SMN*-Transgens in Hirnproben der oben beschriebenen heterozygoten Burghes Mäuse untersucht. Dabei wurden Hirnproben von 4 Muttertieren untersucht, die ab dem 15. Tag der Schwangerschaft über das Trinkwasser mit SAHA (1,33g/l versetzt mit HOP- β -CD) behandelt wurden. Da eine 20 g schwere Maus etwa 3 ml pro Tag trinkt entspricht dies einer Dosierung von 200 mg SAHA pro kg Körpergewicht und Tag. Die Kontrollen erhielten entsprechend nur mit HOP- β -CD versetztes Wasser. Die Behandlungsdauer betrug insgesamt 20 Tage. Der Vergleich der Methylierung zwischen den SAHA behandelten Tieren und den Kontrollen zeigte keine signifikanten Methylierungsunterschiede. SAHA ist also auch bei längerer

Behandlungsdauer, in diesem *in vivo* Experiment, nicht in der Lage, die Methylierung des ^{SMN2}CGI 2 zu beeinflussen.

5.7 Die Behandlung mit SAHA führt nicht zu einer Demethylierung des *Smn*-Gens

Da es sich bei dem *SMN2*-Transgen der Burghes-Mäuse jedoch um ein künstliches Konstrukt handelt (BamH1-Fragment eines BAC-Klons), dem möglicherweise für die Methylierung wichtige regulatorische Sequenzen fehlen, wurde zusätzlich die Methylierung des murinen *Smn*-Gens in den behandelten Tieren und den unbehandelten Kontrollen untersucht, um zu überprüfen ob SAHA *in vivo* einen Einfluss auf die Methylierung dieses Endogens hat, der eventuell in dem künstlichen Transgenkonstrukt des humanen *SMN2* nicht zu beobachten ist. Die Promotorregion des *Smn*-Gens 1500 bp stromaufwärts und stromabwärts vom ATG enthält nur eine CpG-Insel mit einer Länge von 314 bp die von Position -98 bis +215 reicht und insgesamt 34 CpG-Dinukleotide enthält (vergl. Abbildung 61). Der murine *Smn*-Promotorbereich und humane *SMN*-Promotorbereich weisen im Bereich des ATG etwa eine Homologie von 70% auf (Abbildung 62). Die murine CpG-Insel entspricht daher etwa dem humanen ^{SMN}CGI 3 welches eine Größe von 446 bp aufweist, 38 CpG-Dinukleotide enthält und sich von Position -151 bis +295 relativ zum ATG des humanen *SMN*-Gens erstreckt.

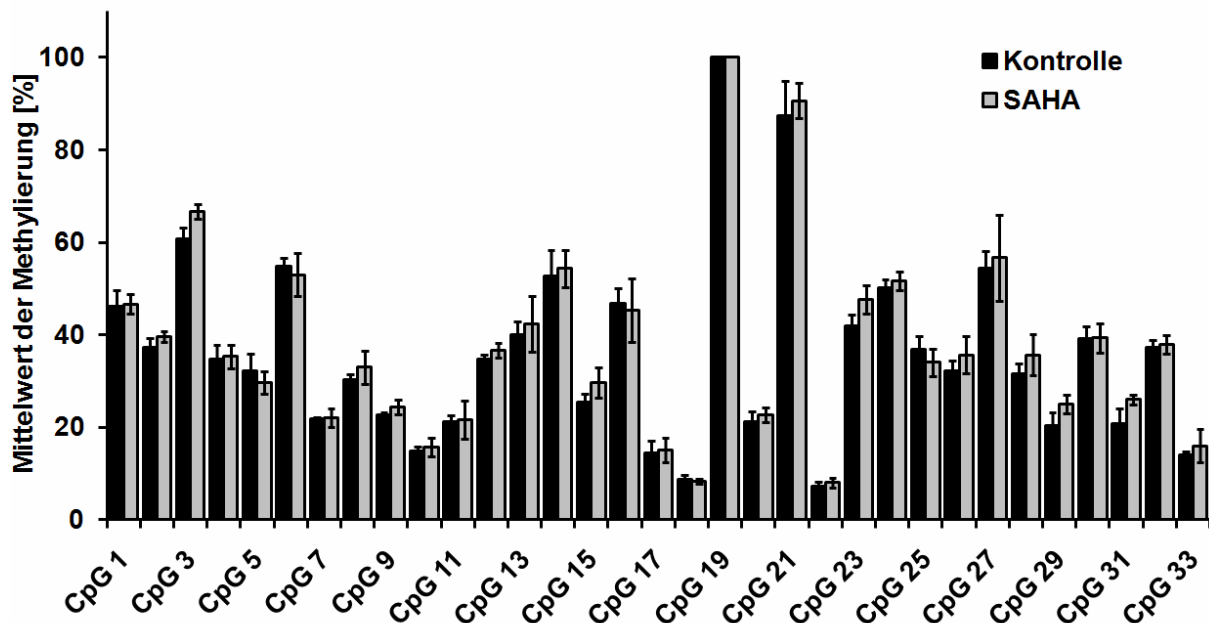
Methylierung des *Smn* Gens in Hirnproben der Burghes Mäuse

Abbildung 40: Methylierung des murinen *Smn* Gens in den mit SAHA behandelten Tieren (n=4) und unbehandelten Kontrollen (n=4). Zwischen beiden Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Auch der Vergleich der Methylierung des murinen *Smn*-Gens zwischen den mit SAHA behandelten Tieren und den Kontrollen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Diese Versuche zeigen, dass SAHA offenbar nicht in der Lage ist, nach oraler Applikation die Methylierung des *SMN2*-Transgens oder des *Smn*-Gens zu beeinflussen. Bezieht man die Ergebnisse aus den Fibroblasten mit ein, so ist SAHA nicht in der Lage die Methylierung des *SMN2*-Gens zu reduzieren und die Aktivierung der Transkription ist nur auf die HDAC hemmende Wirkung zurückzuführen.

5.8 Methylierung des *SMN2*-Transgens in verschiedenen Geweben der Hung SMA-Mäuse

Da das in den Burghes-Mäusen gefundene *SMN2*-Methylierungsprofil nicht dem humanen Methylierungsprofil entspricht, sollte in einem weiteren SMA-Mausmodell (Hung-Mäuse) untersucht werden, ob das Methylierungsmuster dem humanen Methylierungsmuster entspricht, ob sich Unterschiede zwischen den verschiedenen

Gewebe der Mäuse zeigen und ob die Methylierung in der Maus die Expression des *LT-SMN2* beeinflusst. Untersucht wurden hier zwei etwa 6 Monate alte, heterozygote Tiere (*Smn*^{+/-}, *SMN2*^{tg/tg}). Da es sich bei dem integrierten Transgen-Konstrukt um ein Konkatermer handelt, welches 2 *SMN2*-Genkopien aufweist, tragen die homozygoten Mäuse nicht nur 2 *SMN2*-Genkopien wie die Burghes-Mäuse, sondern insgesamt 4 *SMN2*-Genkopien.

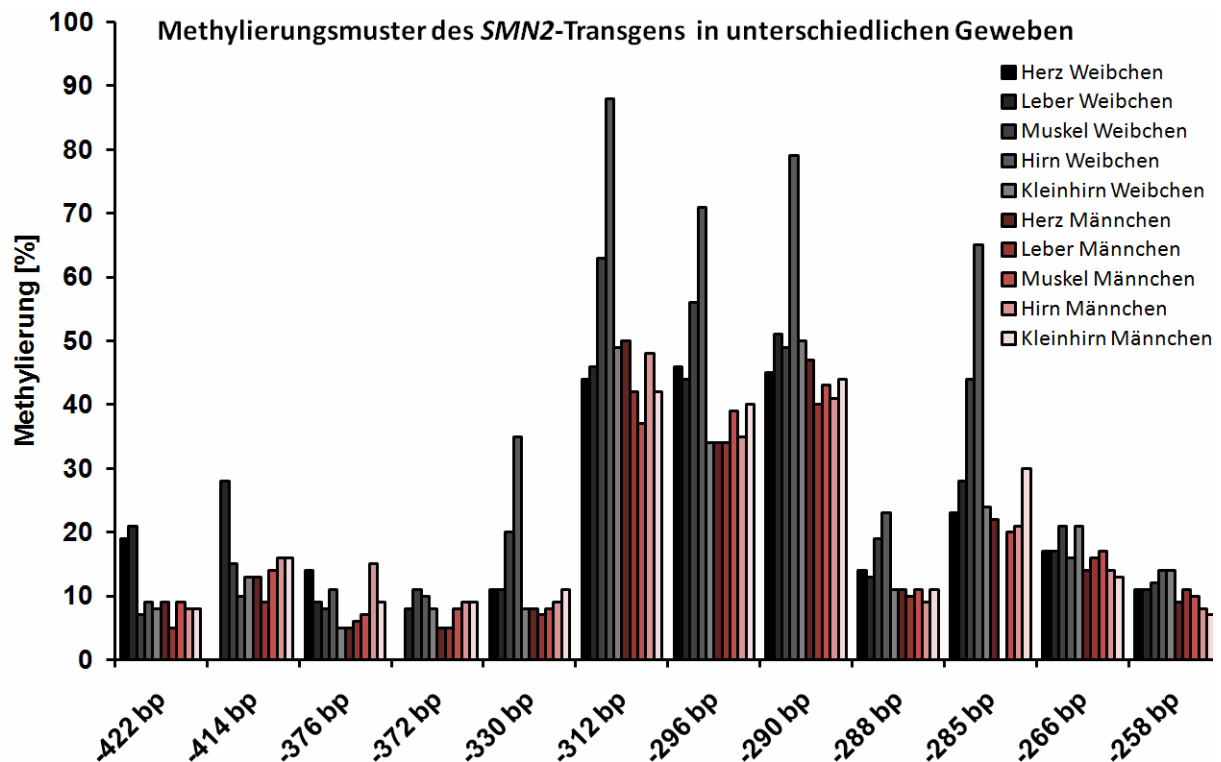


Abbildung 41: Methylierungsprofil des *SMN2*CGI 2 in unterschiedlichen Geweben des SMA-Mausmodells (Hung Mäuse). Untersucht wurden die Gewebe eines männlichen und eines weiblichen Tieres (n=1). Wie schon in den Burghes-Mäusen zeigt das Transgen insgesamt weniger Methylierung im *SMN2*CGI 2. Der Vergleich der Gewebe zeigt für das Männchen keine Unterschiede, während das Weibchen einige Differenzen zwischen den verschiedenen Geweben aufweist.

Die Analyse der *SMN2*CGI 2 Methylierung in den Hirnproben zeigte für die Hung-Mäuse eine etwas höhere Methylierung als in den Burghes-Mäusen. Insbesondere an den Positionen -330, -312, -296, -290 und -285 konnten sowohl für das Hung-Weibchen als auch für das Männchen deutlich höhere Methylierungswerte festgestellt werden, wie der Vergleich in den Hirnproben zeigt (siehe Abbildung 42). Der Vergleich der Methylierungswerte für die Gewebe des untersuchten Männchens zeigt keine signifikanten Unterschiede. Beim Weibchen hingegen zeigt sich eine größere Variation der Methylierung in den einzelnen Geweben (Abbildung 41), wobei

die Methylierung im Muskel und im Hirn meist etwas höher liegt als in den weiteren untersuchten Proben. Gerade an den Positionen -312, -296 und -290 weist das Weibchen in Hirn und Muskelgewebe deutlich höhere Methylierungswerte auf als in den übrigen Geweben.

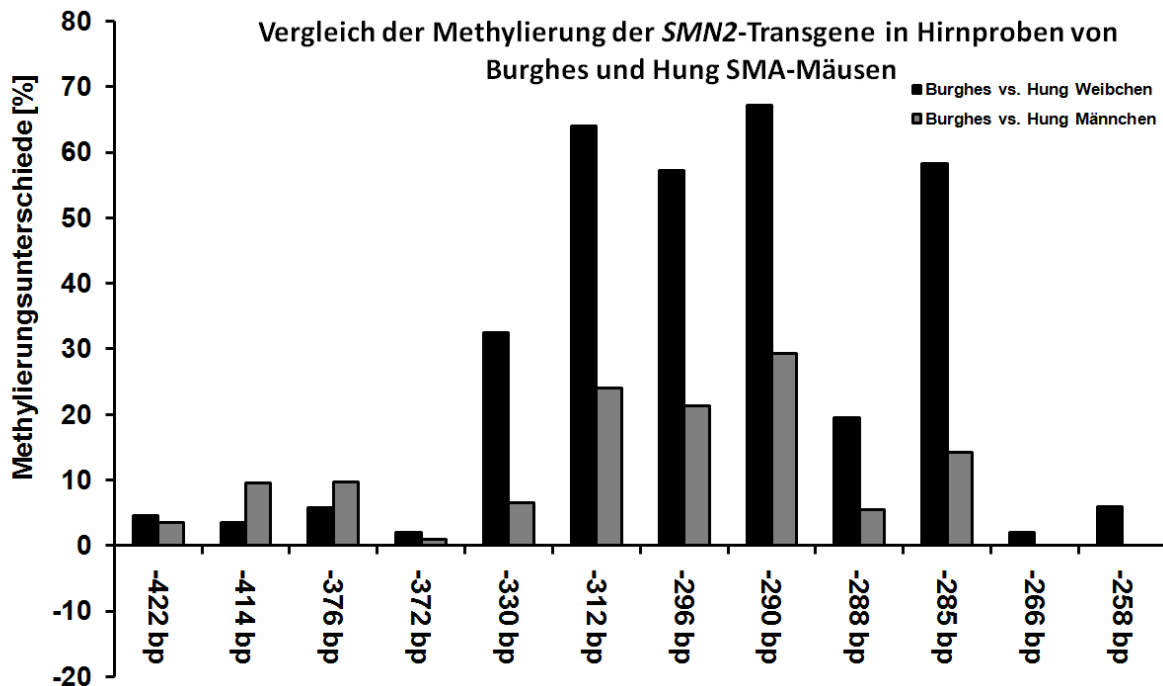


Abbildung 42 Vergleich der Methylierung der *SMN2*-Transgene in Hirnproben von Burghes und Hung SMA-Mäusen. Sowohl das Hung Weibchen als auch das Männchen zeigten insbesondere an den Positionen -330, -312, -296, -290 und -285 mehr Methylierung als die Burghes Mäuse (Weibchen).

Der allgemeine Vergleich der Methylierung in den Hung-Mäusen mit dem Methylierungsmuster in den humanen Proben (Blut, Fibroblasten) zeigt, dass sich auch das Methylierungsmuster dieses Mausmodells deutlich von dem beim Menschen gefundenen Methylierungsprofil unterscheidet. Allerdings sind hier die Unterschiede an den Positionen -296 und -290 (die beim Menschen die Expression des *LT-SMN2* regulieren) nicht so hoch. Daher sollte nachfolgend die *LT-SMN2* Expression in den Geweben der untersuchten Hung-Mäuse gemessen werden und untersucht werden, ob es eine Korrelation der Expression mit der Methylierung im jeweiligen Gewebe gibt, wie sie in den humanen Fibroblasten gezeigt werden konnte.

5.9 Die Expression des *LT-SMN2* ist in neuronalem Gewebe deutlich erhöht

Die Expressionsanalyse in den 6 untersuchten Geweben der beiden Tiere zeigte eine höhere Expression des *LT-SMN2*-Transkripts in den neuronalen Geweben im Vergleich zu den nicht neuronalen Geweben Muskel, Herz und Leber (Abbildung 43). So zeigte das untersuchte Männchen eine 160% (+32% / -28%) höhere *LT-SMN2* Expression im Großhirn im Vergleich zum Muskel. Die Expression im Rückenmark lag mit 337% (+87% / -67%) noch etwas höher. Die stärkste Expression des *LT-SMN2*-Transkripts konnte im Kleinhirn nachgewiesen werden, hier war die *LT-SMN2*-Menge etwa 14 mal so hoch wie im Muskelgewebe. Beim Weibchen wurden ähnliche Ergebnisse gemessen. So lag hier die Expression des *LT-SMN2* mit 552% (+104% / -88%) etwas höher als im Männchen, die Expression im Rückenmark war mit 333% (+12% / -11%) genauso hoch wie beim Männchen. Die Expression im Kleinhirn war sogar fast 20-mal so hoch wie im Muskel (1963% +135% / -126%).

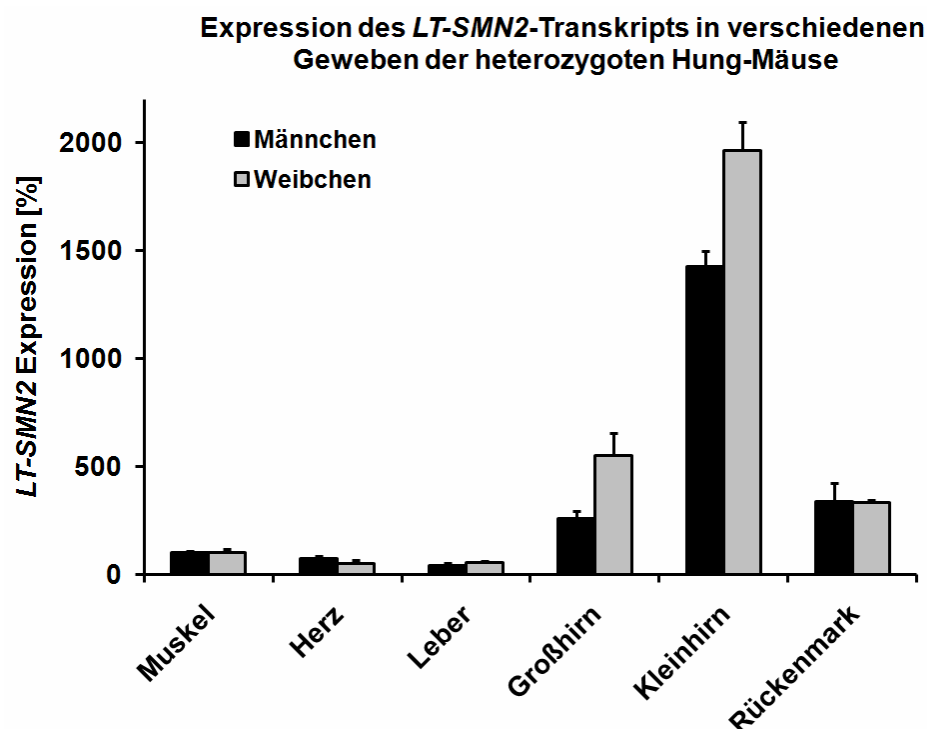


Abbildung 43: Expressionsanalyse des *LT-SMN2*-Transkripts in unterschiedlichen Geweben der Hung-Mäuse. Es zeigt sich eine deutlich höhere Expression in den neuronalen Geweben Großhirn, Kleinhirn und Rückenmark im Vergleich zu den übrigen untersuchten Proben. Die stärkste Expression konnte in beiden Tieren mit 1428% (+70% / -67%) und 1963% (+135% / -126%) im Vergleich zum Muskel im Kleinhirn gemessen werden.

Auch die Expression der *SMN2*-Gesamttranskriptmenge war in den drei neuronalen Geweben etwa 2 bis 2,5-mal höher als in den nichtneuronalen Geweben. Dabei zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen dem männlichen und dem weiblichen Tier (Abbildung 44). Der Vergleich der Ergebnisse der Expressionsanalyse, mit den Ergebnissen der Methylierungsanalyse, zeigt in diesen transgenen Tieren keine Korrelation der Promotormethylierung des *SMN2*-Transgens mit der Expression des *LT-SMN2* Transkripts oder der *SMN2*-Gesamttranskriptmenge. So zeigt das Weibchen eine hohe Expression des *LT-SMN2* im Großhirn obwohl gerade in diesem Gewebe die Methylierung an den Positionen -296 und -290 deutlich erhöht war (Abbildung 41). Das Männchen zeigte in diesem Gewebe deutlich weniger Methylierung, zeigt aber keine stärkere Expression des *LT-SMN2* als das Weibchen. Allerdings lassen diese Ergebnisse nur bedingt Rückschlüsse auf das menschliche ZNS zu, da das Methylierungsmuster beim Menschen große Unterschiede zu dem des Transgens aufweist.

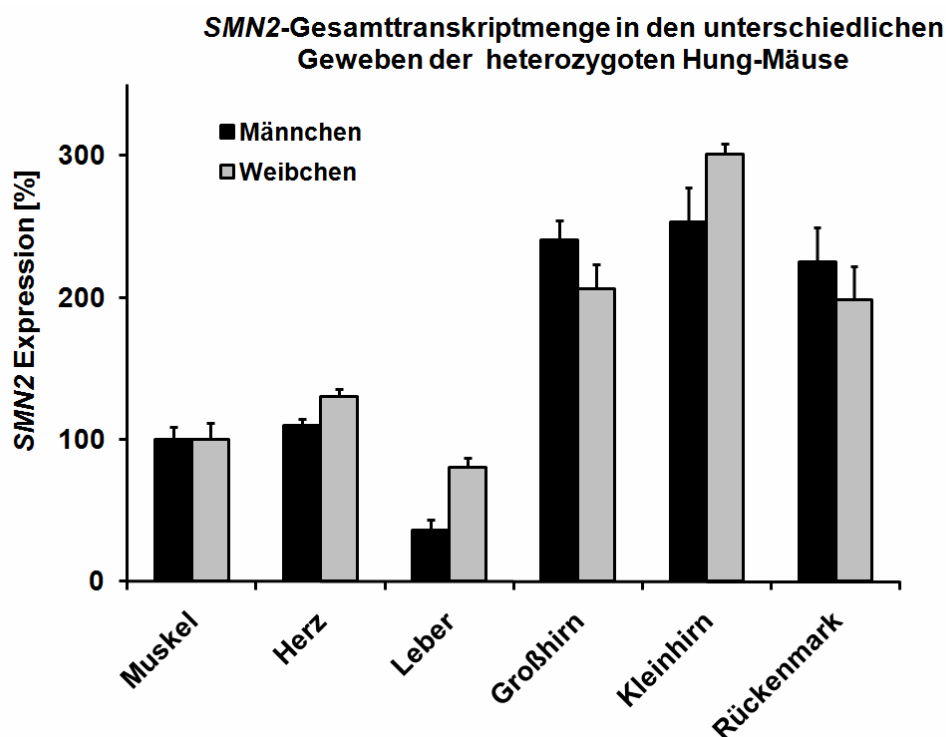


Abbildung 44: Expressionsanalyse der *SMN2*-Transkripte in unterschiedlichen Geweben der Hung-Mäuse. Es zeigt sich auch hier eine höhere Expression in den neuronalen Geweben Großhirn, Kleinhirn und Rückenmark im Vergleich zu den übrigen untersuchten Proben, wenngleich der Unterschied auch nicht so stark ausfällt wie für das *LT-SMN2*-Transkript. Die stärkste Expression konnte in beiden Tieren erneut im Kleinhirn gemessen werden, hier war die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge 2,5- bzw. 3-mal höher als im Muskelgewebe (253% +24% /-22% und 301% ±7%).

5.10 Expression des *LT-SMN*-Transkripts in humanem embryonalem Gewebe

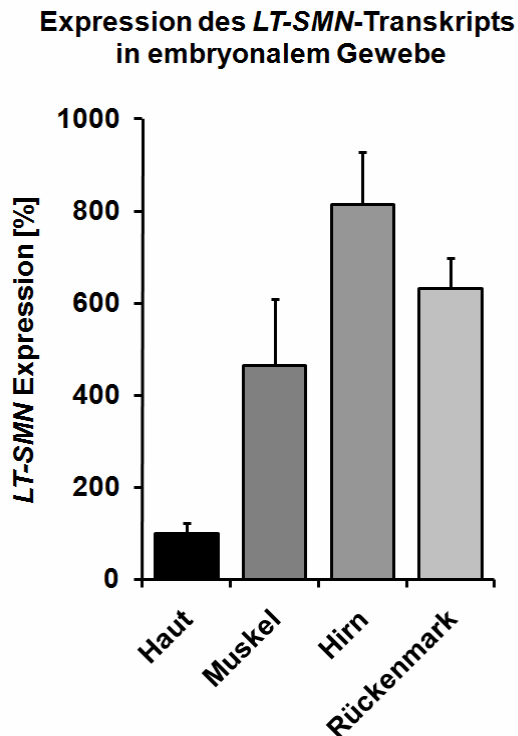


Abbildung 45: Expression des *LT-SMN*-Transkripts in humanem embryonalem Gewebe. Die analysierten Proben stammen aus einer Abortion eines Embryos, bei dem Trisomie 21 diagnostiziert wurde und wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Wirth zur Verfügung gestellt.

Die Analyse der Expression des *LT-SMN*-Transkripts zeigte eine deutlich höhere Expression in den untersuchten neuronalen Geweben (Hirn und Rückenmark) als in der Haut. Die stärkste Expression mit 815% (+115% / -100%) im Vergleich zur Haut konnte im Hirngewebe gemessen werden. Die Expression im Rückenmark lag mit 632% (+66% / -59%) nur etwas niedriger. Auch im untersuchten Muskelgewebe war eine stärkere Expression des *LT-SMN*-Transkripts als in der Hautprobe messbar 464% (+146% / - 111%). Diese Ergebnisse bestätigen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass die Expression der *SMN*-Gene in neuronalem Gewebe im Vergleich zu anderen Geweben erhöht ist (Coover, et al. 1997).

5.11 Analyse der Promotorregion in der Umgebung der ersten Transkriptionsstartstelle

Durch die vorangehenden Experimente konnten wir zeigen, dass die Expression des *LT-SMN2*-Transkripts vom 1. Transkriptionsstartpunkt aus durch DNA-Methylierung gehemmt werden kann. Als nächstes sollte untersucht werden, wie die Hemmung der Expression durch DNA-Methylierung vermittelt wird. Hierzu führten wir zunächst eine *in silico* Analyse der *SMN2*-Promotorregion von Position -350 bis Position -250 durch. Hierzu untersuchten wir diese Region zunächst mittels TESS (*Transcription Element Search System* <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) auf Transkriptionsfaktor Bindestellen. Die Analyse der Promotorregion mittels TESS zeigte eine E2F Bindestelle, die mit dem zweiten CpG Dinukleotid an Position -290 überlappt (Abbildung 46).

```

-350 GGAGGCTGAG GTGGGAGGAT CGCTTGAGCC CAAGAAGTCG AGGCTGCAGT -300
===== (8.7167) T-Ag I00215
===== (12.00) Sp1 R02245, R02245, R02245, R02245, R02245, R02245, R02245, R02245
===== (10.00) T-Ag R01244
===== (10.00) GAL4 R00495
      = === (10.00) CAC-binding protein R04295
      = === (7.6530) CAC-binding I00019
            ===== (10.00) GAL4 R00492
            = === (8.00) E2F+p107 R08845
                  === == (10.00) T-Ag R01372
                        = === (8.7167) T-Ag I00215
                        = === (10.00) T-Ag R01244
                        ===== (10.00) GAL4 R00495

-299 GAGCGGAGAT CGCGCCGCTG CACTCCAGCC TGAGCGACAG GGCGAGGCTC -250
===== (8.00) RAF R00256
===== (16.00) E2F R01852
      = === (8.00) E2F+p107 R08845
            ===== (12.00) ZF5 R01772
            ===== (11.1281) GCF I00152
            ===== (10.00) GCF R02159
            ===== (6.4952) T-Ag Q00168
            = === (11.2677) MEP-1 I00078
            = === (11.00) MTF-1 R02204
            = === (10.00) Sp1 R01021
            = ===== (12.00) TTF-1 R04645, R04645, R04645, R04645, R04645
            ===== (12.00) Zeste R04950, R04950
            ===== (8.00) NF-1 R01681
            = === (10.00) GAL4 R00495
            ===== (12.00) Zeste R04940, R04958
            = === (8.00) E2F+p107 R08845
            ===== (10.00) NF-E R00558
            = === (8.00) E2F+p107 R08845
            ===== (8.7167) T-Ag I00215
            ===== (10.00) T-Ag R01244
            ===== (10.00) GAL4 R00495

```

Abbildung 46: TESS Analyse der *SMN2*-Promotorregion von Position -350 bis -250. Die Bindestellen der jeweiligen Transkriptionsfaktoren sind als farbige Doppelstriche unter der Sequenz dargestellt, dahinter befinden sich der Wert für die Übereinstimmung mit der Konsensusbindesequenz, sowie die Bezeichnung des Transkriptionsfaktors und das zugrundeliegende Modell.

5.12 Nachweis eines sequenzspezifisch bindenden Proteinkomplexes durch EMSA-Analysen

Durch EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) Analysen sollte nachfolgend untersucht werden, ob und welche Transkriptionsfaktoren die *SMN*-Promotorregion von Position -326 bis -266 binden und ob diese Bindung durch die Methylierung der CpG-Dinukleotide in diesem Bereich verstärkt oder vermindert wird. Die EMSA Analyse nutzt die Unterschiede im Laufverhalten von reiner DNA und DNA-Protein Komplexen in einer nativen (nicht denaturierenden) Polyacrylamid-Gelelektrophorese aus. Wobei freie DNA-Komplexe im Gel schneller laufen, während die DNA-Proteinkomplexe länger benötigen und im Gel als „Shift“ zu erkennen sind. Hierfür wurde ein 60 nt langes, Biotin markiertes doppelsträngiges DNA Fragment verwendet, das diese Promotorregion enthält. Dieses Fragment wurde durch die M.SssI Methyltransferase *in vitro* methyliert oder unmethyliert verwendet. Das DNA Fragment wurde dann in den Reaktionsansätzen mit Reaktionspuffer und evtl. HeLa-Kernextrakten (NE) und einem Kompetitor (100 fach konzentriertes Konstrukt) versetzt. Anschließend erfolgte die Auftrennung durch die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

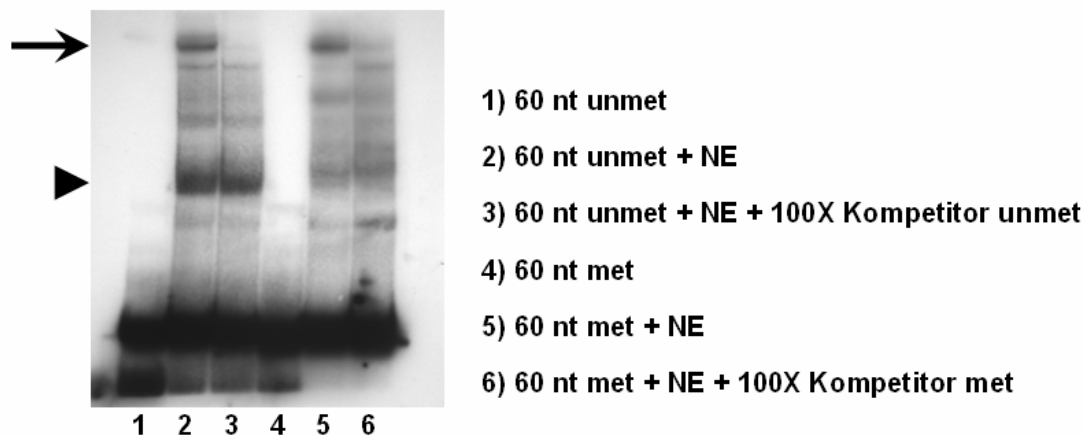


Abbildung 47: EMSA mit einem 60nt langen Biotin markierten DNA-Doppelstrang, der die *SMN*-Promotorregion von Position -326 bis -266 relativ zum ATG enthält. Dieses Fragment erscheint als Bande am unteren Ende des Polyacrylamidgels. Durch Zugabe von 3 µg HeLa Kernextrakten (NE) kommt es zur Bildung von DNA-Proteinkomplexen, die im Gel als zusätzliche Banden erscheinen (2 und 5). Die mit dem Pfeil markierte Bande verschwindet nach der Zugabe eines 100fach konzentrierten Kompetitors (3 und 6) und stellt eine spezifische Interaktion mit der DNA-Sequenz dar, während die mit dem Pfeilkopf markierte Bande nicht verschwindet und vermutlich auf die unspezifische Wechselwirkung des

doppelsträngigen DNA-Fragments mit Proteinen aus den Kernextrakten zurückzuführen ist. Es sind keine Unterschiede zwischen dem methylierten und unmethylierten DNA-Doppelstrang zu erkennen. Die Methylierung des Fragments scheint jedoch die unspezifische Bindung zu verhindern.

Wie in Abbildung 47 zu erkennen ist, führt die Zugabe von Kernextrakten zu dem 60nt langen unmethylierten oder methylierten *SMN*-Promotorfragment zur Bildung von DNA-Proteinkomplexen, die im Gel als zusätzliche Banden zu erkennen sind. Die Zugabe des Kompetitors führte bei beiden DNA-Fragmenten zur Abschwächung der durch den Pfeil markierten Bande. Dabei handelt es sich daher vermutlich um ein Protein oder mehrere sequenzspezifisch bindende Proteine, auf deren Bindung die CpG-Methylierung keinen Einfluss hat. Die übrigen Banden verändern sich durch die Zugabe des Kompetitors nicht, vermutlich handelt es sich hier um sequenzunabhängig bindende Proteine oder Proteinkomplexe. Die in Abbildung 47 mit dem Pfeilkopf markierte zusätzliche Bande ist in den Proben mit unmethylierter DNA deutlich stärker als in denen mit methylierter DNA. Hier scheint also die DNA-Methylierung die unspezifische Bindung zu reduzieren.

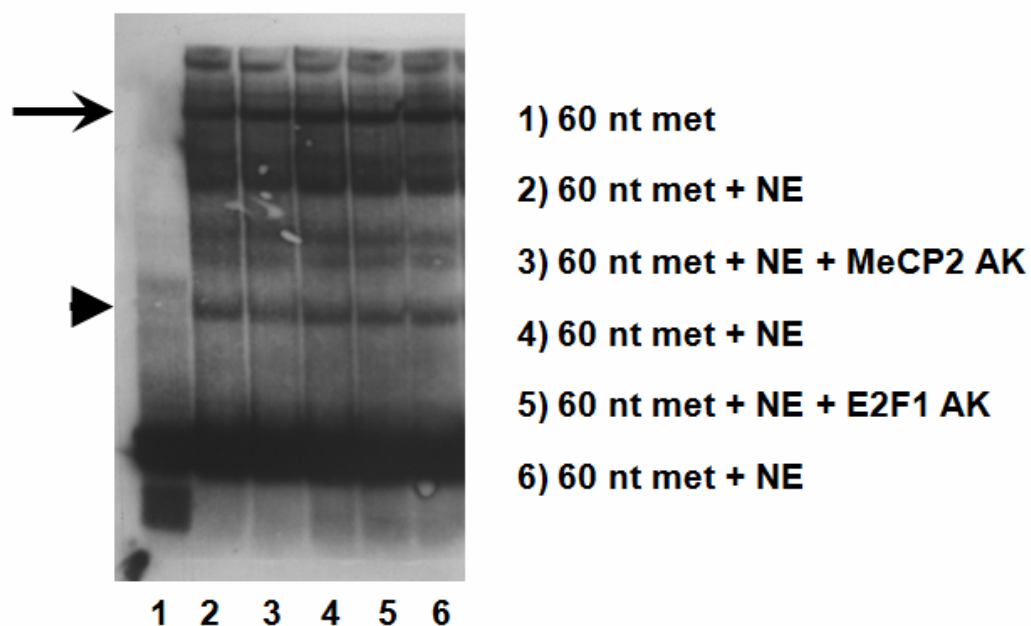


Abbildung 48: EMSA „Supershift Analysen“. Dem Reaktionsansatz wurden neben dem mit Biotin markierten DNA Fragment noch die Hela Kernextrakte und 3 µg Antikörper zugesetzt. Durch die Zugabe der Antikörper ist keine weitere Veränderung des Bandenmusters zu erkennen. Die verwendeten Antikörper scheinen also an keinen der gebildeten DNA-Proteinkomplexe zu binden.

Um zu untersuchen, um welche Proteine/Proteinkomplexe es sich bei der mit dem Pfeil markierten Bande in Abbildung 47 handelt, sollten sogenannte „Supershift Analysen“ durchgeführt werden. Dabei werden dem EMSA-Reaktionsansatz neben den HeLa-Kernextrakten noch Antikörper gegen die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren oder DNA bindenden Proteine zugesetzt. Binden diese an die Zielproteine im DNA-Proteinkomplex, so verändert sich das Laufverhalten dieser größeren Komplexe erneut, und im Gel sind zusätzliche Banden zu erkennen bzw. zuvor beobachtete Banden verschwinden. Hier sollte die Bindung des Transkriptionsfaktors E2F1 untersucht werden, für den durch die *in silico* Analyse des Promotors eine Bindestelle in dieser Promotorregion identifiziert wurde. Außerdem soll untersucht werden, ob es sich bei dem gefunden Proteinkomplex möglicherweise um einen Komplex handelt, der den methylierungsabhängig bindenden Transkriptionsfaktors MeCP2 enthält. Da MeCP2 wie in Abschnitt 2.3 und 5.13 beschrieben ein guter Kandidat für die Vermittlung der Repression eines Gens durch Methylierung (die durch HDAC-Inhibitoren aufgehoben werden kann) ist. Wie in Abbildung 48 zu erkennen ist, führte die Zugabe der beiden Antikörper nicht zu einer Veränderung des Bandenmusters, die Antikörper binden also nicht an die gebildeten DNA-Proteinkomplexe.

5.13 Das *Silencing* der *LT-SMN2*-Transkription mittels DNA-Methylierung wird durch MeCP2 vermittelt

Es existieren drei Modelle, wie DNA-Methylierung die Transkription eines Gens inhibieren kann: (1) DNA-Methylierung kann die Chromatinstruktur direkt verändern und so die Zugänglichkeit des Promotors für die Transkriptionsmaschinerie senken. (2) DNA-Methylierung kann die Bindung von spezifischen Transkriptionsfaktoren blockieren und so die Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren mit dem Promotor verhindern. (3) Methylierte CpG-Dinukleotide werden durch spezielle methylierungssensitive Transkriptionsfaktoren (methyl-CpG DNA-binding proteins MBPs) erkannt. Die MBP Proteinfamilie enthält neben MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 auch MeCP2 (Hendrich, et al. 1998). Außerdem weist das Protein Kaiso und verwandte Proteine die Eigenschaft auf, an methylierte CpG-Dinukleotide zu binden. Die methylierungsabhängig bindenden Proteine MeCP2, Kaiso, MBD1 und MBD2 können dann als Repressoren der Transkription fungieren, indem sie weitere Co-Repressoren und Chromatin Remodeling Proteine wie z.B. Sin3a und HDACs zum Promotor rekrutieren (Jones, et al. 1998, Nan, et al. 1998).

Da die HDAC-Inhibitoren unter den verwendeten Bedingungen keine Demethylierung des *SMN2*-Promotors bewirkten, aber dennoch die Transkription durch Umgehung des *Silencings* durch Methylierung steigern konnten, vermuten wir, dass die Methylierung im *SMN2*-Promotor von MBPs erkannt wird und diese dann HDACs an den Promotor rekrutieren und so die Transkription stilllegen. Dieser Mechanismus ist insbesondere für das MeCP2 Protein bereits beschrieben worden (Jones, et al. 1998, Nan, et al. 1998). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden zunächst in der Fibroblastenzelllinie ML17 *knock-down* Experimente durchgeführt. Diese Versuche zeigten, dass der *knock-down* mittels siRNA effektiv funktioniert und die Reduktion der MeCP2-Menge einen Anstieg der *LT-SMN2*-Expression zur Folge hat (Abbildung 49). Als nächstes sollte mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) untersucht werden, ob MeCP2 tatsächlich wie vermutet an die *SMN2*-Promotorregion in der Umgebung des ersten Transkriptionsstartpunktes bindet und so die Expression durch die DNA-Methylierung reguliert wird.

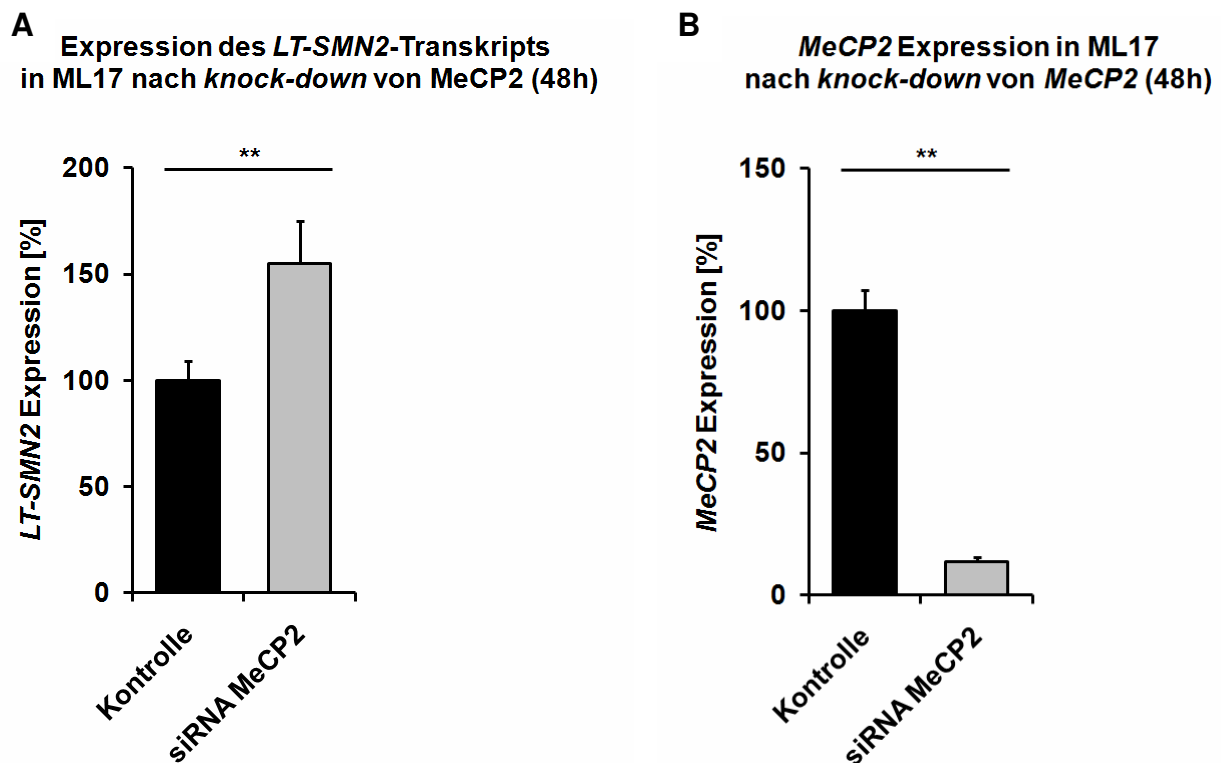


Abbildung 49: (A) *Real-time* PCR Analyse der *LT-SMN2*-Transkriptmenge nach *knock-down* von MeCP2 für 48h in der Fibroblastenzelllinie ML17. Die Expression des *LT-SMN2* steigt signifikant auf 155% (+20% / -17%) im Vergleich zur Kontrollen ($p=0,0040$). (B) *Real-time* PCR Analyse der *MeCP2*-Transkriptmenge nach *knock-down* von MeCP2 mittels MeCP2 siRNA. Die *MeCP2*-Transkriptmenge konnte durch die siRNA signifikant auf ~12% im Vergleich zur Kontrolle reduziert werden.

Die ChIP Analysen unter Verwendung eines MeCP2-Antikörpers und ^{SMN2}CGI2 spezifischer Primer für die Region von -372 bis -266 zeigten eine Bindung des MeCP2-Proteins an diese Promotorregion in den ML17 SMA-Fibroblasten (Abbildung 50). Die Untersuchung der Region weiter stromaufwärts und stromabwärts vom ersten Transkriptionsstartpunkt sollte zeigen, ob hier ebenfalls eine Assoziation des MeCP2-Proteins mit dem Promotor feststellbar ist oder ob sich die Bindung des MeCP2-Proteins auf den Transkriptionsstartpunkt beschränkt.

Nachweis der Bindung von MeCP2 an den *SMN*-Promotor

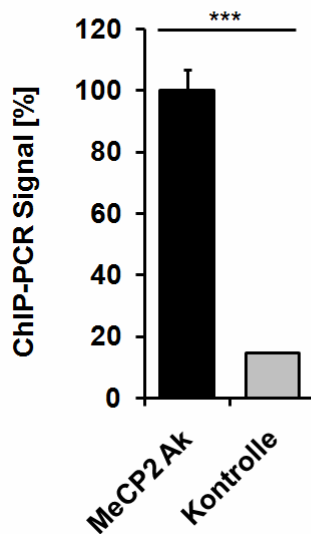


Abbildung 50 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mittels MeCP2 Antikörper und *real-time* Primern für die genomische *SMN2*-Promotorregion in ML17 von Position -372 bis -266. Als Kontrolle wurde ein IgG Kaninchen Antikörper von *Diagenode* verwendet. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Anreicherung dieser Promotorregion durch die Verwendung des MeCP2-Antikörpers.

Die Analyse der Region von Position -631 bis +59 erfolgte mit 6 Primerkombinationen, welche diesen Bereich teilweise überlappend abdecken (Abbildung 51). Obwohl für jede der 6 untersuchten Regionen eine Anreicherung durch die Verwendung des MeCP2-Antikörpers im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden konnte, zeigten vier Primerkombinationen nur etwa die Hälfte des relativen ChIP PCR Signals im Vergleich zu den Primerkombinationen von Position -372 bis -266 und -167 bis -43. Diese Ergebnisse zeigen, dass MeCP2 im *SMN2*-Promotor verstärkt in der Region zwischen den Positionen -372 bis -43 relative zum ATG bindet. Dies entspricht genau der Region, welche die Transkriptionsstartpunkte des *SMN2*-Promotors enthält. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass MeCP2 eine Rolle bei der Stilllegung des *SMN2*-Gens durch Methylierung spielt.

**Analyse der Region um den ersten
Transkriptionsstartpunkt nach ChIP mit MeCP2 Antikörper**

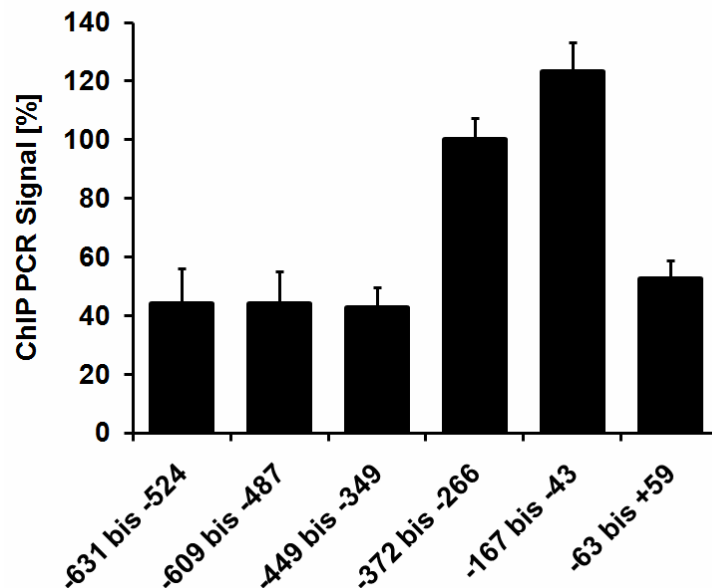


Abbildung 51: ChIP Analyse der *SMN2* Promotorregion in ML17 von Position +59 bis -631 relativ zum ATG. Dargestellt sind die Ergebnisse der *real-time* PCR mit Primerkombinationen für 6 Abschnitte dieses Promotorbereichs. Für jede Primerkombination wurde eine PCR mit DNA aus der ChIP mit dem MeCP2 Antikörper und der Kontrollreaktion mit dem IgG Kaninchen Antikörper durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend bezogen auf die Region -372 bis -266, die den ersten Transkriptionsstartpunkt enthält. Es zeigt sich nur für den Abschnitt von -372 bis -43 eine stärkere Anreicherung durch Immunopräzipitation mit dem MeCP2-Antikörper. Die übrigen Abschnitte weisen eine geringere Assoziation mit dem MeCP2-Protein auf.

Weitere ChIP Versuche in der Zelllinie ML17 sollten zeigen, ob durch die Behandlung mit dem demethylierenden Zebularin die Bindung von MeCP2 an den *SMN2*-Promotor reduziert werden kann. Die Behandlung mit Zebularin für 48 bzw. 96 Stunden führte zu einer Reduktion der MeCP2-Bindung an den Promotor in der Region von Position -372 bis -266 (Abbildung 52). Nach 96 Stunden konnte eine signifikante Reduktion der Bindung von MeCP2 um 37% gemessen werden.

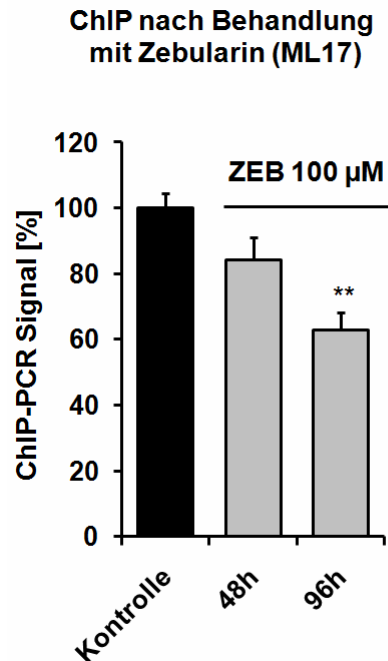


Abbildung 52: ChIP Analyse in ML17 Zellen nach Behandlung mit 100 µM Zebularin für 48 bzw. 96 Stunden. Die Bindung von MeCP2 an die Region von Position -372 bis -266 wird durch die Reduktion der Methylierung nach 96 Stunden signifikant auf 63% (+5,1% / -4,7%) ($p=0,0016$) verringert.

Die Stilllegung der Expression vom ersten Transkriptionsstartpunkt des *SMN2*-Gens durch Methylierung wird also, zumindest teilweise, durch die Bindung des MeCP2-Proteins vermittelt. Es ist bekannt, dass MeCP2 seine Funktion als Repressor der Transkription durch die Rekrutierung weiterer Chromatin modifizierender Proteine insbesondere der HDAC1 und HDAC2 erfüllt (Jones, et al. 1998, Nan, et al. 1998). Durch die Behandlung der Zelllinie ML17 mit panHDAC-Inhibitoren wie SAHA oder Depsipeptide konnte die Expression der *SMN*-Transkripte deutlich gesteigert werden (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28). Wir vermuten daher, dass die Bindung von MeCP2 an den Promotor in der Region der Transkriptionsstartpunkte zur Rekrutierung von HDAC Aktivität an den Promotor führt, Ergebnis ist eine Verringerung der Expression. Daher sollte in den folgenden siRNA-Experimenten überprüft werden, ob bereits durch den *knock-down* einzelner HDAC Isoenzyme die Expression der *SMN*-Transkripte gesteigert werden kann. Außerdem sollte die Funktion des Transkriptionsfaktors E2F1 überprüft werden, für den mittels TESS Analyse eine Bindestelle vorhergesagt wurde, die sich in unmittelbarer Nähe der 1. TSS befindet. Die Vorversuche zeigten, dass eine Behandlung mit den siRNAs für 48

Stunden den optimalen Zeitpunkt für die Analysen darstellt (Abbildung 70 im Anhang).

Die Untersuchung der Transkriptmengen zeigte für alle untersuchten Transkripte, bis auf *HDAC3* und *HDAC10*, eine zufriedenstellende *knock-down* Effizienz. Die Transkriptmengen für die *HDACs* 1, 2, 5, 6, 7, 8, 11 sowie *MeCP2* und *E2F1* konnten um etwa 90% verringert werden (Abbildung 53).

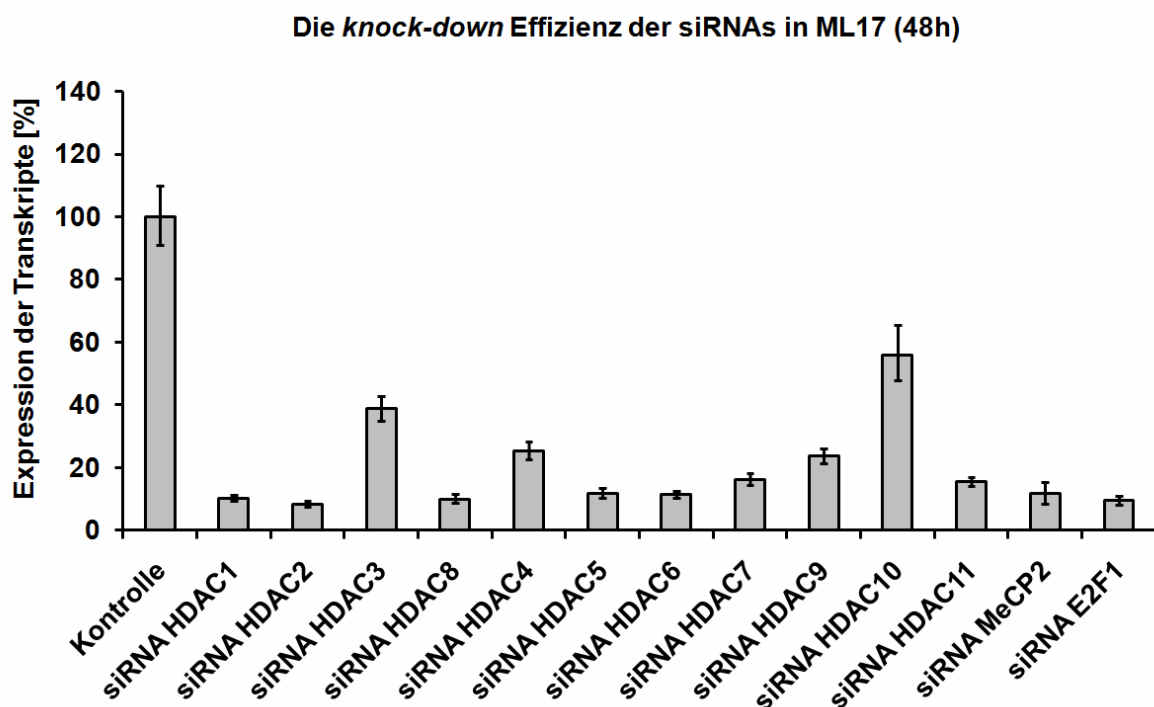


Abbildung 53: Nachweis der *knock-down* Effizienz in ML17 nach 48h Stunden. Die Expression der Transkripte konnte durch die siRNAs auf 56% (+9,6% / - 8,1%) bis 8,4% (+1,0% / -0,9%) verringert werden. Als Kontrolle diente die *AllStars negative control* siRNA (Qiagen) und als Kontrollgen wurde β -Aktin verwendet.

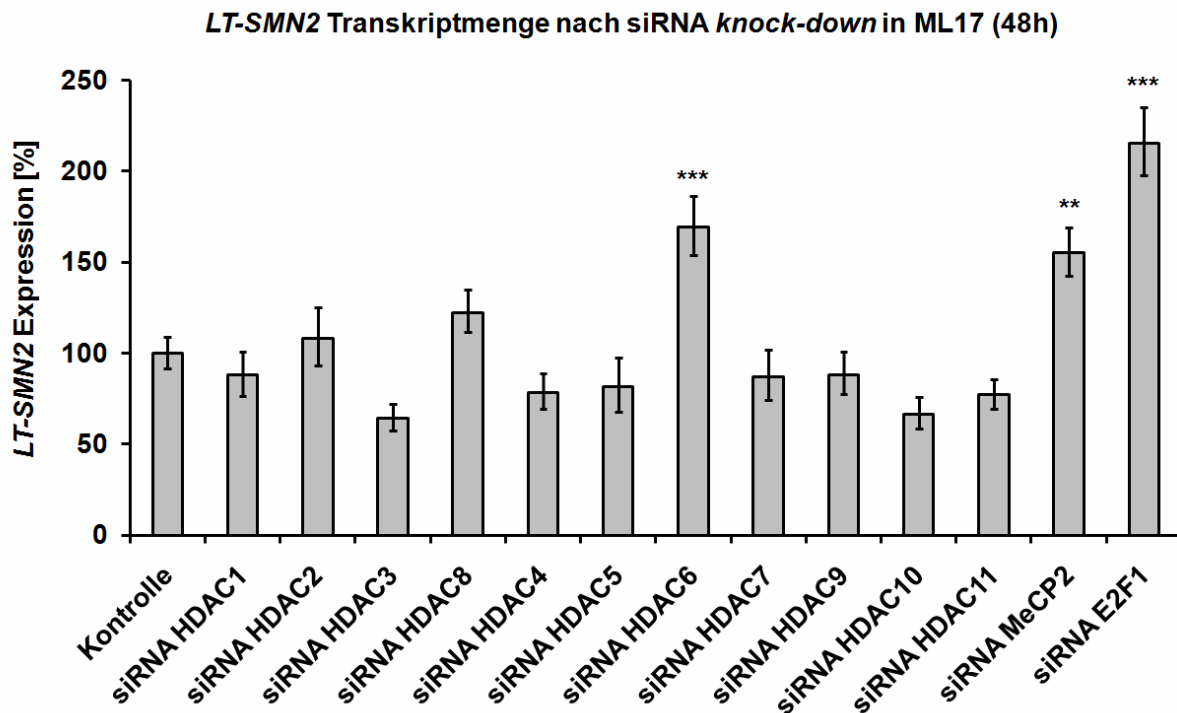


Abbildung 54: Expressionsanalyse des *LT-SMN2*-Transkripts mittels *real-time* PCR nach *knock-down* der HDAC Isoenzyme 1-11, *MeCP2* und *E2F1* für 48h relativ zu β -Aktin. Dabei wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die Analyse der *LT-SMN2*-Transkriptmengen nach *knock-down* der HDAC Isoenzyme zeigte nur minimale Effekte für die Isoenzyme der Klasse I (HDAC 1, 2, 3 und 8). Dabei konnte durch den *knock-down* von HDAC8 eine maximale Steigerung der *LT-SMN2*-Expression auf 122,4% (+12,3% / -11,1%) erreicht werden (Abbildung 54). Für die Klasse II der HDACs konnte nur durch den *knock-down* von *HDAC6* eine signifikante Steigerung der *LT-SMN2*-Transkriptmenge auf 169,3% (+16,9% / -15,2%) nachgewiesen werden ($p < 0,0001$). Die Reduktion der übrigen Isoenzyme dieser Klasse führte eher zu einer Reduktion der *LT-SMN2*-Expression auf etwa 67% bis 88% im Vergleich zur Kontrolle. Auch der *knock-down* von *HDAC11* bewirkte eine Reduktion der *LT-SMN2*-Transkriptmenge um 23%. Eine signifikante Induktion der *LT-SMN2*-Transkription auf 155,0% (+20,2% / -17,4%) konnte hingegen wie beschrieben (Abbildung 36) durch den *knock-down* von *MeCP2* erreicht werden ($p = 0,0039$). Der *knock-down* von *E2F1* führte ebenfalls zur signifikanten Steigerung der Transkription vom ersten Transkriptionsstartpunkt ($p < 0,0001$) und erhöhte die *LT-SMN2*-Menge nach 48h am Stärksten auf 215,1% (+26,4% / -23,3%).

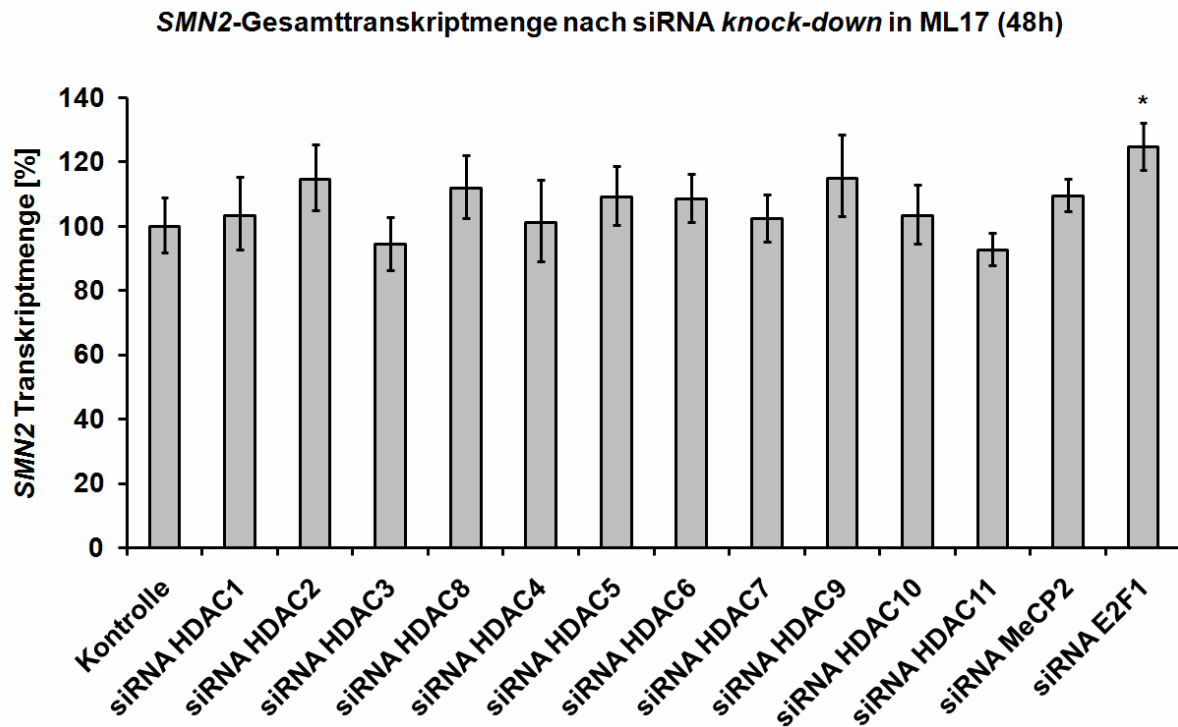


Abbildung 55: SMN2-Gesamttranskriptmenge nach *knock-down* der HDAC Isoenzyme 1-11, MeCP2 und E2F1 für 48h. Nur nach *knock-down* von E2F1 konnte eine signifikante Expressionsteigerung ($p=0,0150$) auf 124,6% (+9,6% / -8,9%) erreicht werden. Dabei wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die Analyse der SMN2 Gesamttranskriptmenge zeigt für den *knock-down* aller untersuchten Gene außer E2F1 keine signifikante Änderung der SMN2 Expression. Der *knock-down* von E2F1 führt zu einer geringen Steigerung der SMN2 Gesamttranskriptmenge auf 124% (+9,6% / -8,9%) ($p=0,0150$). Berücksichtigt man die Standardabweichung, so kann für die übrigen Proben kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch den *knock-down* eines einzelnen HDAC-Isoenzym die Expression vom 1. Transkriptionsstartpunkt, wenn überhaupt dann nur moderat gesteigert werden kann. Die SMN2-Gesamttranskriptmenge konnte durch den *knock-down* einzelner HDAC-Isoenzyme nach 48h in ML17 nicht signifikant gesteigert werden. Der *knock-down* der Transkriptionsfaktoren MeCP2 und E2F1 bewirkte eine deutliche Steigerung der LT-SMN2-Transkriptmenge und geringe Steigerungen der SMN2-Gesamttranskriptmenge im Fall von E2F1.

Da bekannt ist, dass die Funktion von HDAC-Isoenzymen in Zelllinien teilweise redundant ist, sollte im Folgenden überprüft werden, ob durch den *knock-down* der

gesamten Klasse 1 der HDAC-Enzyme (*HDAC1, 2, 3, 8*) einen Einfluss auf die Expression der *SMN2*-Transkription hat. Hierfür erfolgte ein *knock-down* in der Zelllinie ML17.

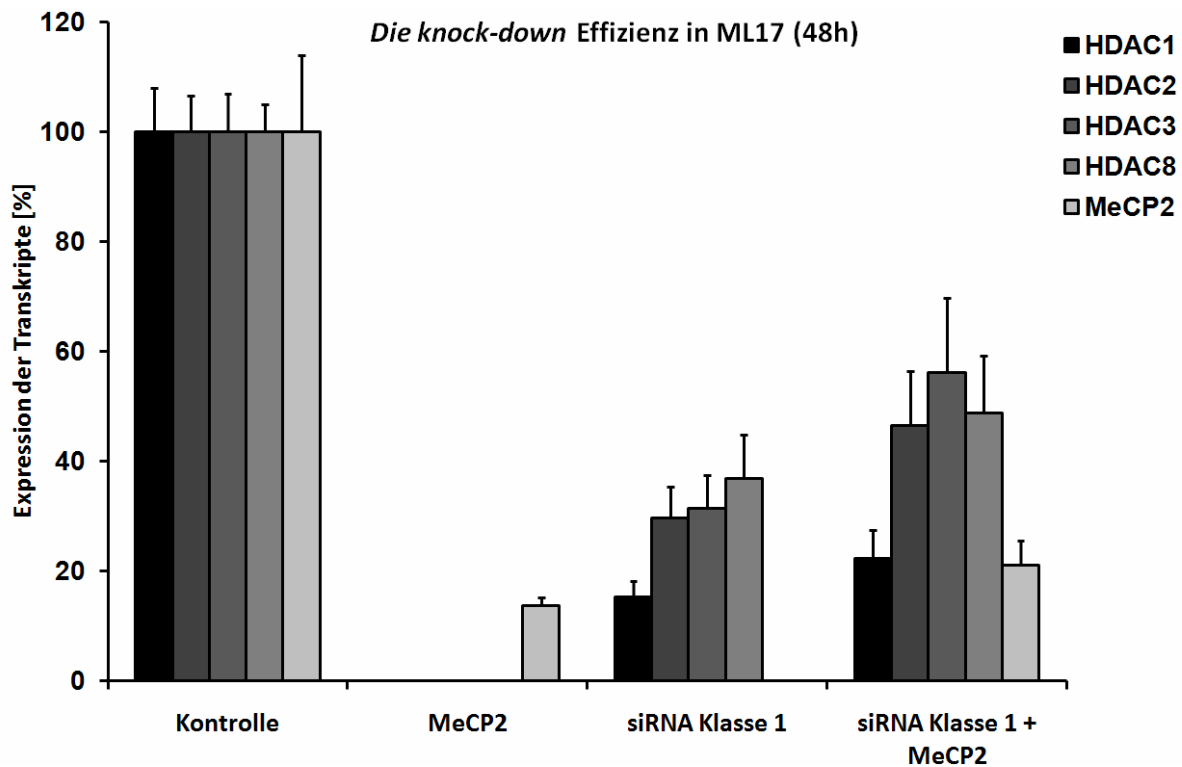


Abbildung 56 Die *knock-down* Effizienz der HDAC Isoenzyme der Klasse1 in der SMA-Fibroblastenzelllinie ML17. Der *knock-down* der gesamten Klasse 1 HDACs war weniger effizient als der *knock-down* der einzelnen HDACs. So konnte hier die Expression nur auf etwa 30% bis 40% im Vergleich zur Kontrolle vermindert werden.

Die Analyse der *knock-down* Effizienz zeigte eine Verschlechterung der Effektivität durch die gleichzeitige Verwendung von mehreren siRNAs. So konnte beispielsweise durch die Verwendung der siRNAs gegen HDAC1-3 und 8 die *HDAC1*-Transkriptmenge auf 15,3% (+2,9% / -2,5%) verringert werden (Abbildung 56), die von HDAC8 hingegen nur auf 36,9% (+7,9% / -6,5%). Durch die zusätzliche Verwendung der MeCP2 siRNA konnte die *HDAC1*-Transkriptmenge nur noch auf 22,4% (+ 5,1% / -4,1%) verringert werden, die *HDAC8*-Transkriptmenge auf 48,9% (+10,3% / -8,5%).

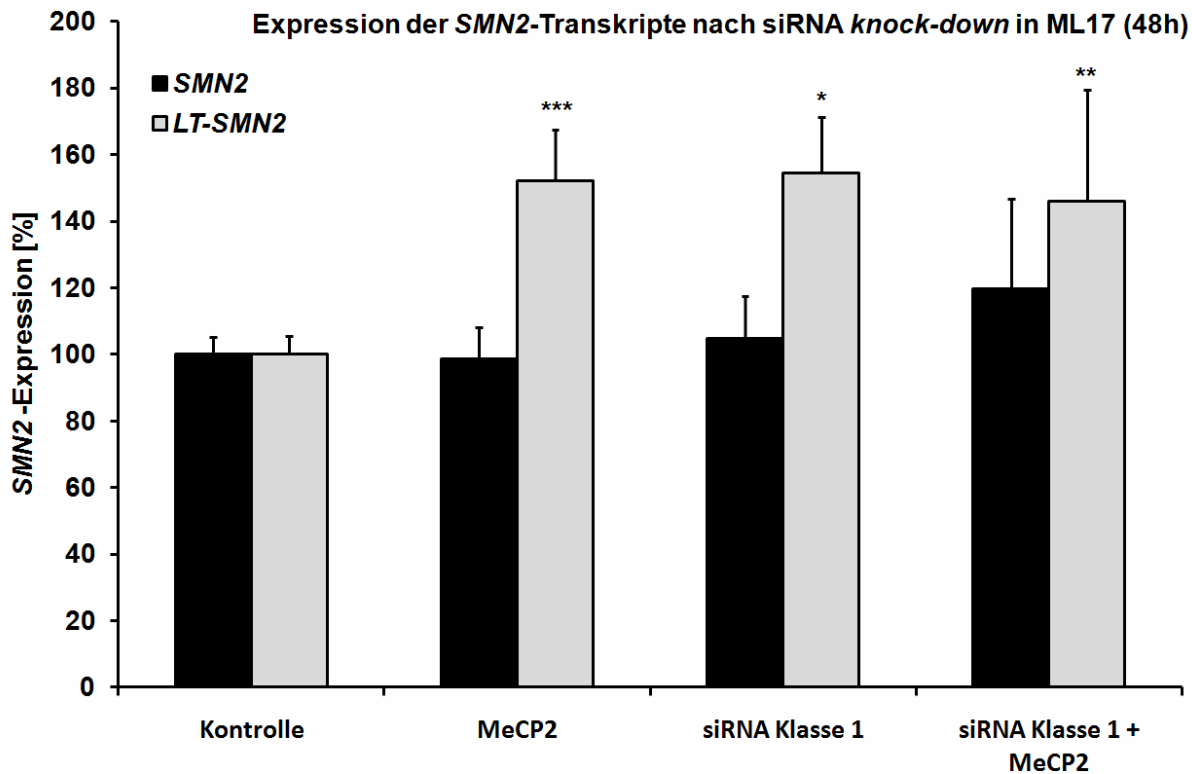


Abbildung 57: Expression der *SMN2*-Transkripte in ML17 nach *knock-down* von *MeCP2*, den HDACs der Klasse 1 (HDAC 1, 2, 3, 8) und den HDACs der Klasse 1 mit *MeCP2* relativ zu β -Aktin. Durch den *knock-down* konnten keine signifikanten Änderungen der *SMN2*-Gesamttranskriptmenge gemessen werden, die *LT-SMN2*-Transkriptmenge konnte jedoch in allen experimentellen Ansätzen signifikant gesteigert werden. Dabei wurden folgende Signifikanzlevel unterschieden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die Analyse der *SMN2*-Transkripte zeigte keine signifikanten Effekte auf die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge nach dem siRNA *knock-down* von *MeCP2*, der Klasse 1 HDACs oder der Klasse 1 HDACs mit *MeCP2* (Abbildung 57). Die *LT-SMN2*-Expression hingegen konnte durch den *knock-down* von *MeCP2* wie schon in den vorigen Experimenten gezeigt signifikant auf +152% (+15% / -14%) gesteigert werden ($p=0,00012$). Die Reduktion der Transkriptmengen aller Histondeacetylasen der Klasse 1 durch die siRNAs bewirkte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der *LT-SMN2*-Transkriptmenge auf 155% (+17% / -15%) ($p= 0,0143$). Die zusätzliche Verwendung der *MeCP2* siRNA führte nicht zu einer weiteren Steigerung der *LT-SMN2*-Expression, allerdings war hier auch eine Abnahme in der Effizienz des *knock-downs* durch die gleichzeitige Verwendung von 5 siRNAs feststellbar. Die *LT-SMN2*-Transkriptmenge konnte im Vergleich zur Kontrolle signifikant auf 146% (+33,6% / -27,3%) gesteigert werden ($p= 0,0045$).

6 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität des *SMN*-Minimalpromotors durch DNA-Methylierung reduziert wird. Die weiteren Analysen lassen vermuten, dass das *SMN* CGI 2 funktionell relevant für die Expression der *SMN*-Genkopien ist. In Fibroblastenzelllinien und Blutproben von *SMN1*-deletierten SMA-Patienten, die die gleiche Zahl an *SMN2*-Genkopien tragen, aber an unterschiedlichen Schweregraden der SMA erkranken, konnte gezeigt werden, dass die Methylierung des *SMN* CGI 2 mit dem Schweregrad der SMA korreliert. Die phänotypischen Unterschiede in diskordanten SMA-Familien sind hingegen nicht auf Unterschiede in der Methylierung des *SMN2* CGI 2 zurückzuführen. Auch für die Erkrankung von Patienten mit einer Deletion des *SMN2*-Gens konnte die Hypermethylierung des *SMN1* CGI 2 als Ursache der Erkrankung ausgeschlossen werden. Außerdem konnte in *in vitro* Analysen gezeigt werden, dass die Expression vom ersten Transkriptionsstartpunkt des *SMN2*-Gens durch Methylierung gehemmt wird und dass das „Gene Silencing“ durch HDAC-Inhibitoren umgangen werden kann. Dabei haben die HDAC-Inhibitoren nur einen geringen Einfluss auf die Methylierung des *SMN2*-Promotorbereichs. Die Untersuchung des molekularen Mechanismus ergab, dass die Inhibition der *LT-SMN2*-Expression durch MeCP2 vermittelt wird. In *knock-down* Experimenten zeigte sich, dass der *knock-down* einzelner Histondeacetylasen nicht ausreicht, um die Expression vom ersten Transkriptionsstartpunkt zu steigern.

6.1 Die Aktivität des *SMN*-Minimalpromotors wird durch DNA-Methylierung reduziert

Die eigenen Vorarbeiten (Diplomarbeit Jan Hauke 2006) zeigten, dass der Promotor der *SMN*-Genkopien methyliert ist und dass diese Methylierung möglicherweise die Expression des *SMN2*-Gens beeinflusst. Um zu untersuchen, ob die Aktivität des *SMN*-Promotors tatsächlich mit seiner Methylierung korreliert, wurden Promotoraktivitätstests mit methylierten und unmethylierten Luziferasekonstrukten durchgeführt. Der Promotoraktivitätstest in HEK293T Zellen und in humanen Vorhautfibroblasten zeigte eine signifikante Reduktion der Promotoraktivität der verwendeten Konstrukte nach *in vitro* Methylierung durch die M.SssI

Methyltransferase. Diese Ergebnisse sowie die Feststellung, dass die Expression des *SMN2*-Gens durch demethylierende Substanzen gesteigert werden kann (siehe Abbildung 8 und Abbildung 36) verdeutlichen, dass die *SMN2*-Genaktivität durch DNA-Methylierung reprimiert wird. Ein inhibitorischer Effekt der DNA-Methylierung auf die Expression eines Gens konnte in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden (Esteller, et al. 1999, Grayson, et al. 2005). Die hier gezeigten Ergebnisse für die *SMN*-Gene stimmen mit der allgemeinen Auffassung überein, dass die DNA-Methylierung die Expression eines Gens abschalten oder reduzieren kann (Suzuki, et al. 2008).

6.2 Das *SMN*CGI 2 ist funktionell relevant für die Expression der *SMN*-Genkopien

Wir konnten zeigen, dass die Promotorregion der *SMN*-Gene vier putative CpG-Inseln enthält (Abbildung 7). Durch die Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels Sequenzierung oder Pyrosequenzierung konnte für die SMA-Fibroblastenzelllinien ML5 und ML16 ein ähnliches Methylierungsmuster nachgewiesen werden. So zeigen *SMN2*CGI 1 und *SMN2*CGI 4 eine Hypermethylierung, *SMN2*CGI 3 ist hypomethyliert und *SMN2*CGI 2 zeigt mittlere Methylierungswerte. Die Analyse der *SMN1*- und *SMN2*-Methylierung in Blutproben zeigten später ähnliche Methylierungsmuster, so dass die hier diskutierten Ergebnisse vermutlich für beide *SMN*-Genkopien gültig sind. Da CpG-Inseln allgemein als kurze unmethylierte DNA-Abschnitte definiert sind (Weber, et al. 2007), kann nur *SMN2*CGI 3 mit einer Länge von 446 bp und einem GC-Gehalt von 62,1% als klassische CpG-Insel angesehen werden. Die übrigen CpG-Inseln können jedoch auf Grund ihrer relativ geringen Größe und ihres GC-Gehalts (*SMN2*CGI 1: 252 bp und ein GC-Gehalt von 54,8%; *SMN2*CGI 2: 223 bp und 58,3% GC sowie *SMN2*CGI 4: 303 bp und ein GC-Gehalt von 59,4%) nur als intermediäre CpG-Inseln bezeichnet werden (Weber, et al. 2007). Die Unterschiede in der CpG-Dichte (Verhältnis zwischen den erwarteten und der tatsächlichen Anzahl an CpG-Dinukleotiden) verdeutlichen die Unterschiede zwischen dem starken *SMN2*CGI 3 (CpG-Dichte von 0,94), welches normalerweise unmethyliert vorliegt, und den *SMN2*CGIs 1, 2 und 4 (CpG-Dichten von 0,74; 0,79 und 0,79), die in der Regel stark methyliert sind (Suzuki, et al. 2008). In der Tat scheint die Methylierung der CpG-Inseln des *SMN2*-Promotors diesen Regeln zu folgen. Überhaupt entsprechen die

SMN-Genkopien einem klassischen Gen, was die Verteilung der CpG-Inseln betrifft. So weisen etwa 70% aller Gene CpG-Inseln im Promotorbereich auf (Saxonov, et al. 2006) und etwa die Hälfte aller CpG-Inseln umfasst die Transkriptionsstartstelle eines Gens (Suzuki, et al. 2008). Dies ist für die *SMN*-Gene der Fall; das ^{SMN}CGI 2 enthält den ersten Transkriptionsstartpunkt und der zweite Transkriptionsstartpunkt an Position -242 befindet sich nur wenige Basenpaare stromabwärts von der Grenze des ^{SMN}CGI 2. Zusammen mit den Ergebnissen der Promotoraktivitätstests zeigen diese Analysen erstmals, dass das ^{SMN}CGI 2, obwohl es nicht die Kriterien einer starken CpG-Insel erfüllt, trotzdem eine funktionelle Relevanz für den Schweregrad der SMA und für mögliche pharmakologische Therapieansätze dieser Erkrankung hat.

6.3 Die Methylierung des ^{SMN}CGI 2 korreliert mit dem Schweregrad der SMA

Obwohl bekannt ist, dass das *SMN2*-Gen den größten Einfluss auf den Schweregrad der Erkrankung hat, zeigen einige SMA-Patienten bei identischer *SMN1*- Mutation und gleicher *SMN2*-Kopienzahl unterschiedliche Krankheitsverläufe. Patienten, die 2 *SMN2*-Genkopien tragen, erkranken in der Regel an einer SMA Typ I, hingegen zeigen nur etwa 10 bis 20% der Patienten mildere Verläufe (Cusco, et al. 2006, Feldkotter, et al. 2002). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die *SMN2*-Genkopien bei Patienten, die an einer schweren SMA erkranken, denen bei Patienten mit milderem Verlauf funktionell nicht gleichwertig sind.

Die Methylierung des *SMN2*-Gens im Blut von 10 SMA Typ I Patienten zeigte ein ähnliches Muster wie die untersuchten SMA-Fibroblastenzelllinien und es konnten nur sehr geringe interindividuelle Unterschiede zwischen den Patienten gefunden werden (Abbildung 15). Diese Ergebnisse bestätigen, dass das *SMN2*-Methylierungsmuster sehr konserviert ist und legen die Vermutung nahe, dass bereits geringe Änderungen der Methylierung des *SMN2*-Promotors die Expression bzw. Funktion des Gens beeinträchtigen können. Ähnliche Effekte konnten beispielsweise für das *BDNF* (*brain derived neurotrophic factor*), das *RELN* (Reelin) Gen (Grayson, et al. 2005, Lubin, et al. 2008) oder für das Insulin-Gen (Kuroda, et al. 2009) gezeigt werden.

Der Vergleich der DNA-Methylierung in den untersuchten CpG-Inseln im Blut der 10 SMA Typ I mit dem Methylierungsmuster von 7 SMA Typ III Patienten zeigte insgesamt an 7 Positionen signifikante Methylierungsunterschiede. Die Methylierung an 6 der 7 Positionen korrelierte mit dem Schweregrad der Erkrankung (siehe Abbildung 17). Die Typ I Patienten zeigten also mehr Methylierung. Im *SMN2*CGI 2, das wie beschrieben funktionell relevant für die Expression des *SMN2*-Gens ist, konnten an den Positionen -296 und -290 Methylierungsunterschiede von 27,4 bzw. 14,2 Prozentpunkten festgestellt werden, die mit dem Schweregrad der SMA korrelieren. Diese Unterschiede konnten auch zwischen Fibroblasten von SMA Typ I und Typ III Patienten gefunden werden (siehe Abbildung 18). Es konnte also für zwei verschiedene Gewebe eine Korrelation der Methylierung im *SMN2*CGI 2 mit dem Schweregrad der Erkrankung nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich zwar nicht um die bei der SMA betroffenen α -Motoneuronen, jedoch haben die Ergebnisse der Arbeit von Eckhardt et al. (Eckhardt, et al. 2006) gezeigt, dass sich die DNA-Methylierungsmuster zwischen verschiedenen Geweben einer Person nur geringfügig unterscheiden. Daher ist zu vermuten, dass die untersuchten SMA Typ I Patienten auch im zentralen Nervensystem und den α -Motoneuronen höhere Methylierungswerte im *SMN2*CGI 2 aufweisen als die Typ III Patienten. Kürzlich wurde eine Mutation des *SMN2*-Gens entdeckt (c.859G>C), die ebenfalls in der Lage ist den Schweregrad der SMA bei gleicher Anzahl an *SMN2*-Kopien zu modulieren (Prior, et al. 2009). Träger der Mutation profitieren in diesem Fall davon, dass ein exonischer Spleißverstärker entsteht, was zur Bildung von mehr *SMN2*-Volllängetranskripten führt. Um sicherzustellen, dass nur die Methylierung von *SMN2*-Genkopien verglichen wird, welche die gleiche Sequenz aufweisen, sollten Patienten, die Träger dieser Mutation sind, aus den Methylierungsanalysen ausgeschlossen werden. Falls darunter SMA Typ III Patienten mit höheren Methylierungswerten sind, könnten sich die Methylierungsunterschiede zwischen den Typ I und Typ III Patienten noch erhöhen. Für den Patienten mit der DNA-Nummer 4929 (ML74) konnte inzwischen die c.859G>C Mutation homozygot nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von Frau Prof. Dr. Wirth). Daher scheint der sehr milde Phänotyp (SMA Typ IIIb) hauptsächlich durch diese Mutation bedingt zu werden. Die geringe Methylierung korreliert aber dennoch mit einer stärkeren Expression des *LT-SMN2*, was vermutlich den Krankheitsverlauf weiter abmildert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Methylierung des *SMN2*-

Promotorbereichs einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der SMA hat. Pathogene Effekte der DNA-Methylierung wurden insbesondere im Zusammenhang mit Krebserkrankungen zahlreich gefunden (Rauch, et al. 2008, Suter, et al. 2004, Wang, et al. 2009), konnten aber beispielsweise auch für das *FMR1*-Gen beim Fragilen-X-Syndrom gefunden werden (Pietrobono, et al. 2005).

6.4 Die phänotypischen Unterschiede in diskordanten SMA-Familien sind nicht auf Unterschiede in der Methylierung des ^{SMN2}CGI 2 zurückzuführen

Die Untersuchung der Methylierung im ^{SMN2}CGI 2 im Blut von diskordanten SMA-Familien zeigte keinen Unterschied zwischen den haploidentischen Geschwistern. Die phänotypischen Unterschiede dieser Geschwister sind also nicht auf Methylierungsunterschiede des ^{SMN2}CGI 2 zurückzuführen. Inzwischen konnte von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Wirth an unserem Institut gezeigt werden, dass ein anderer Faktor für die diskordanten Phänotypen in den Familien Nr. 34 und 482 verantwortlich ist (Oprea, et al. 2008). Dabei handelt es sich um das Plastin3-Protein, welches eine regulatorische Funktion bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts hat. Die verstärkte Expression dieses X-chromosomalen Genprodukts scheint bei Frauen, die auf Grund ihres Genotyps an einer SMA erkranken müssten, protektiv zu wirken. Es konnte gezeigt werden, dass Plastin3 an Aktin bindet, hierdurch das Verhältnis von globulärem (G-Aktin) zu fibrillärem (F-Aktin) Aktin ändert und so zur Bündelung der Aktinfilamente beiträgt. Es ist bekannt, dass die G-/F-Aktin-Regulation insbesondere für das Wachstum der Axone sowie für deren Zielfindung und Verzweigung auch in α -Motoneuronen funktionell relevant ist. Die stärkere Expression des Plastin3 hat zur Folge, dass mehr funktionelle Verbindungen der Motoneuronen zu den Muskelzellen erhalten bleiben und weniger α -Motoneuronen zu Grunde gehen. Für die erste untersuchte Familie (Abbildung 25) konnte bislang kein krankheitsmodifizierendes Gen identifiziert werden. Auch die Methylierung des *SMN2*-Gens scheint keine Rolle zu spielen. Die c.859G>C Mutation des *SMN2*-Gens, die wie beschrieben einen milden Phänotyp zur Folge hat (Prior, et al. 2009), ist als Ursache für den diskordanten Phänotyp in dieser Familie eher auszuschließen, da die Geschwister haploidentisch sind (eine *de novo* Mutation ist sehr unwahrscheinlich). Daher gibt es vermutlich neben dem Plastin3 weitere Genprodukte, die den Krankheitsverlauf der SMA positiv oder negativ beeinflussen

können. Vielversprechende Kandidaten sind hier Gene, die für die Integrität des Zytoskeletts relevant sind, den Auswuchs der Axone regulieren oder für die Bildung der neuromuskulären Verbindungen zwischen Muskel- und Nervenzellen/Axonon funktionell relevant sind. So konnte gezeigt werden, dass der *knock-out* des neuroprotektiv wirkenden *ZPR1*-Gens zu verstärkter Neurodegeneration führt (Doran, et al. 2006). Durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Wirth konnten jedoch in diskordanten Familien das *ZPR1*-Gen und weitere mit dem SMN-Protein interagierende Proteine als Krankheitsursache ausgeschlossen werden (Helmken, et al. 2003). In dieser Familie könnte also ein weiterer *Modifier* aus den oben genannten Kandidaten den Krankheitsverlauf beeinflussen.

6.5 Die Erkrankung von Patienten mit einer Deletion des *SMN2*-Gens ist nicht auf eine Hypermethylierung des ^{*SMN1*}CGI 2 zurückzuführen

Auch die Erkrankung der *SMN2*-deletierten SMA-Patienten mit 2 *SMN1*-Kopien scheint auf einen anderen Pathomechanismus zurückzuführen zu sein. Methylierungsunterschiede zwischen SMA-Patienten und gesunden Kontrollen, die eine Deletion des *SMN2*-Gens aufweisen, konnten nicht identifiziert werden. Jedoch konnte bei diesen Personen gezeigt werden, dass das Methylierungsmuster des *SMN1*-Gens dem des *SMN2*-Gens entspricht. Die Methylierungsmuster beider *SMN*-Genkopien sind also konserviert. Dies bestätigt die Hypothese, dass bereits geringe Änderungen der Methylierung die Funktion der Gene beeinflussen kann. Da die Methylierung der Promotorregion bei den hier beschriebenen Patienten aber nicht die Ursache der Erkrankung ist und es sich um sporadische Fälle handelt, kann nur vermutet werden, dass hier andere Gene eine Rolle spielen und es sich um andere Entitäten der SMA handelt. Wie beschrieben scheint beispielsweise das *ZPR1*-Gen ein neuroprotektiver Faktor zu sein. Mutationen, die zum Funktionsverlust dieses oder anderer neuroprotektiver Proteine führen, können möglicherweise in diesen sporadischen Fällen eine SMA in Personen auslösen, die eigentlich durch die *SMN1*-Genkopien vor einer Erkrankung geschützt sind. Bei einer weiteren neurodegenerativen Erkrankung der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) konnte beispielsweise das *KIFAP3* (*Kinesin associated protein 3*) Gen als modifizierender Faktor in Patienten, die an der sporadischen Form der ALS erkrankt sind, gefunden werden. Ein Polymorphismus in der Nähe dieses Gens korreliert mit der

schwächeren Expression des Gens und ist mit einem milderem Krankheitsverlauf assoziiert (Landers, et al. 2009). Die genaue Rolle in der Pathogenese der ALS ist noch unklar, aber da das Proteine unter anderem eine Funktion im axonalen Transport hat, ist auch für die spinale Muskelatrophie eine krankheitsmodifizierende Funktion dieses Proteins/Gens denkbar.

6.6 Die Expression vom ersten Transkriptionsstartpunkt des *SMN2*-Gens wird durch Methylierung gehemmt

Die funktionelle Relevanz der Methylierung an den Positionen -296 und -290 wird weiter verdeutlicht durch die Tatsache, dass der erste Transkriptionsstartpunkt der *SMN*-Genkopien mit der Position -296 übereinstimmt. Die Untersuchungen in den Fibroblastenzelllinien ML17, ML22 und ML74 zeigten eine inverse Korrelation der Expression von diesem Transkriptionsstartpunkt (*LT-SMN2*) mit der Methylierung an den Positionen -296 und -290. Die Methylierung scheint also die Expression vom ersten Transkriptionsstartpunkt zu hemmen (

Abbildung 19 undAbbildung 20). Es ist bislang noch nicht bekannt, wie DNA-Methylierung die Stilllegung der Expression eines Gens vermittelt. Vermutlich wirken dabei auch mehrere Mechanismen zusammen. So zeigen einige Ergebnisse, dass auch die Methylierung der 3' proximal gelegenen Regionen entscheidend für die Expression eines Gens sein kann (Appanah, et al. 2007), während andere Untersuchungen zu dem Ergebnis kommen, dass die DNA-Methylierung durch die Hemmung der Bindung von Transkriptionsfaktoren oder durch die Bindung von methylierungsabhängigen Faktoren wie z.B. MeCP2 im 5' gelegen Promotorbereich wirken (Kaludov, et al. 2000). Diese können dann mit der Transkriptionsmaschinerie interagieren oder Histondeacetylasen an das Chromatin rekrutieren und so lokal zur Repression der Expression führen. Die gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Methylierung die Transkription direkt am Transkriptionsstartpunkt hemmt. Die weiteren Ergebnisse zeigten, dass MeCP2 und die Histondeacetylasen vermutlich an der Repression durch Methylierung beteiligt sind.

Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die DNA-Methylierung eine wichtige Rolle in der Regulation der *SMN2*-Expression spielt. Bei Patienten, die an einer sporadischen Form der SMA erkranken, scheint die DNA-Methylierung jedoch

nicht von Bedeutung zu sein. Um zu untersuchen ob die DNA-Methylierung als prognostischer Marker bei Patienten verwendet werden kann, welche die gleiche Anzahl an *SMN2*-Kopien aufweisen, sollen jetzt Patienten aus unserem Kollektiv untersucht werden, die mehrere *SMN2*-Kopien aufweisen und trotzdem an einer schweren Form der SMA erkranken.

6.7 Die *LT-SMN2*-Expression ist in neuronalem Gewebe erhöht

Die gezeigten Ergebnisse liefern erste Hinweise, dass die *SMN2*-Genkopien funktionell nicht gleichwertig sind, da die DNA-Methylierung die Expression des *LT-SMN2*-Gens reduziert. Der Anteil der *LT-SMN2*-Transkripte an der *SMN2* Gesamttranskriptmenge lag in der Fibroblastenzelllinie des untersuchten SMA Typ I Patienten bei unter 5%. Möglicherweise erklärt die Reduktion der Expression durch Methylierung, warum dieser Transkriptionsstartpunkt bislang nur von Monani et al. (Monani, et al. 1999) in cDNA aus humanem adultem Rückenmarksgewebe gefunden wurde, während andere Arbeitsgruppen in Proben aus HeLa-Zellen und in den anderen untersuchten Geweben diesen Transkriptionsstartpunkt nicht nachweisen konnten (Echaniz-Laguna, et al. 1999, Germain-Desprez, et al. 2001). Die Frage, warum der erste Transkriptionsstartpunkt von diesen Arbeitsgruppen auch in neuronalem Gewebe nicht gefunden werden konnte, bleibt auch nach der Untersuchung der gewebespezifischen Expression in adulten transgenen Mäusen unbeantwortet. Hier zeigte sich nämlich eine deutlich höhere Expression des *LT-SMN2* in neuronalem Gewebe im Vergleich zu nichtneuronalem Gewebe (siehe Abbildung 43). So zeigte sich im Rückenmark beispielsweise eine >3fach höhere *LT-SMN2*-Expression als in Muskelgewebe, Herz oder Leber. Diese Ergebnisse decken sich wiederum mit den *SMN*-Expressionsanalysen der Arbeitsgruppe von C. Sumner (Kernochan, et al. 2005), die zeigen konnten, dass die *SMN* Protein- und RNA-Menge in neuronalem Gewebe (Hirn und Rückenmark) höher ist als in nichtneuronalem Geweben wie Niere oder Leber. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Menge an *SMN*-Protein, die aus *LT-SMN2*-Transkripten in neuronalem Gewebe gebildet wird, groß genug ist, um Einfluss auf den Zelltod der α -Motoneuronen zu nehmen. Anschließend sollte im SMA-Mausmodell untersucht werden, ob die Expression des *LT-SMN2*, wie für die humanen Fibroblasten gezeigt,

mit der Methylierung des ^{SMN2}CGI 2 korreliert. Allerdings zeigte die Untersuchung des Methylierungsgrades in beiden untersuchten Mausmodellen deutliche Unterschiede zur Methylierung des humanen *SMN2*-Gens. So konnte für das ^{SMN2}CGI 2 deutlich weniger Methylierung in den Mäusen nachgewiesen werden als in den untersuchten humanen Proben (Vergl. Abbildung 15 und Abbildung 41). Die Analyse der Methylierung zeigte jedoch in den Hung-Mäusen gewebespezifische Unterschiede, insbesondere im untersuchten Weibchen, jedoch konnte dabei keine Korrelation der Expression mit der Methylierung des ^{SMN2}CGI 2 festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression des *LT-SMN2* nicht alleine durch die DNA-Methylierung reguliert wird, sondern dass auch gewebespezifische Faktoren die Transkription beeinflussen. Dabei stellt sich die Frage, inwieweit sich die im Mausmodell gewonnenen Ergebnisse (z.B. was die Aktivierung der *SMN2*-Expression durch HDAC-Inhibitoren betrifft) auf den Menschen übertragen lassen, wenn ein Teil der Regulation der *SMN2*-Expression im Mausmodell nicht mit den Verhältnissen im Menschen übereinstimmt. Daher erscheint es sinnvoll, Untersuchungen mit Wirkstoffen nicht nur *in vitro* in Zellkulturexperimenten und *in vivo* in Mausmodellen zu testen, sondern beispielsweise auch das hier gezeigte „*ex vivo*“ System der organotypischen Hirnschnittkulturen zur Untersuchung der Wirksamkeit neuer Substanzen im ZNS des Menschen zu verwenden.

6.8 Das *SMN2* „Gene Silencing“ durch DNA-Methylierung kann durch HDAC-Inhibitoren umgangen werden

Neben der gefundenen Korrelation zwischen der Methylierung an Position -296 und -290 und dem Schweregrad der SMA ist der Zusammenhang mit der Expression des *LT-SMN2* auch für eine pharmakologische Behandlung der SMA durch HDAC-Inhibitoren von Bedeutung. Es ist bekannt, dass die beiden Hauptmechanismen der epigenetischen Genregulation (DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung) in der Regulation der Expression zusammenwirken (Jones, et al. 1998, Nan, et al. 1998). Wie beschrieben wird die *LT-SMN2*-Expression in der Zelllinie ML17 durch Methylierung inhibiert. Durch die Behandlung dieser SMA-Fibroblastenzelllinie mit den 6 getesteten panHDAC-Inhibitoren wie der Hydroxamsäure Vorinostat (SAHA), dem Benzamid M344 oder dem zyklischen Tetrapeptid Romidepsin (FK-228) konnte

die Stilllegung der Transkription vom ersten Transkriptionsstartpunkt aufgehoben und die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge bis zu 5fach gesteigert werden. Diese Ergebnisse konnten in den untersuchten organotypischen Hirnschnittkulturen bestätigt werden. Die Behandlung mit den isoenzymspezifischen HDAC-Inhibitoren MS-275, VPA und Phenylbutyrat zeigte hingegen nur moderate Effekte in der Fibroblastenzelllinie bzw. den Hirnschnitten (siehe Abbildung 30 und Abbildung 34). Diese Ergebnisse zeigen, dass die panHDAC-Inhibitoren den isoenzymspezifischen Wirkstoffen in ihrer Wirksamkeit bezüglich der Aktivierung der *SMN2*-Expression überlegen zu sein scheinen bzw. möglicherweise über weitergehende Funktionen verfügen. Daraus ergibt sich, dass beispielsweise die panHDAC-Inhibitoren Vorinostat (SAHA), Panobinostat (LBH589) und Romidepsin (FK-228), die von der amerikanischen FDA (*Food and Drug Administration*) zur Krebstherapie zugelassen sind (www.cancer.gov) oder sich in Phase II der klinischen Testung befinden, als Kandidaten für die Behandlung der SMA in Frage kommen, falls die bisher in klinischen Untersuchungen getesteten Wirkstoffe VPA und Phenylbutyrat nicht die gewünschte Effektivität zeigen. Insbesondere Vorinostat (SAHA) scheint ein geeigneter Wirkstoff zu sein, da nachgewiesen werden konnte, dass er die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Hockly, et al. 2003) und nach oraler Einnahme eine gute biologische Verfügbarkeit und Aktivität aufweist (Duvic, et al. 2007).

6.9 HDAC-Inhibitoren haben nur geringen Einfluss auf die Methylierung des *SMN2*-Promotorbereichs

Die Untersuchung des Wirkmechanismus der HDAC-Inhibitoren sollte zeigen, ob die getesteten Substanzen neben der Acetylierung der Histone auch noch die Demethylierung der *SMN2*-Promotorregion zur Folge hat. Diese demethylierenden Eigenschaften von HDAC-Inhibitoren sind bereits für einige Wirkstoffe und Zielgene beschrieben (Detich, et al. 2003, Dong, et al. 2007, Milutinovic, et al. 2007). In der Zelllinie ML17 zeigten sich nach 48 Stunden Behandlung mit VPA, Phenylbutyrat oder SAHA nur wenige signifikante Änderungen der Methylierung des *SMN2*CGI 2 (siehe Abbildung 37). Die drei untersuchten Substanzen sind also in der Lage, in diesem *in vitro* Versuch die Methylierung des *SMN2*CGI 2 geringfügig zu senken. Dabei zeigten sich jedoch für SAHA im Vergleich zu VPA und Phenylbutyrat nur geringe Unterschiede in der demethylierenden Aktivität. Diese Unterschiede können

aber die massiven Unterschiede in der Aktivierung der Expression vom ersten Transkriptionsstartpunkt nicht erklären. Außerdem zeigte die *in vivo* Untersuchung im SMA-Mausmodell keine demethylierende Wirkung für SAHA. Allerdings entsprach das Methylierungsmuster des *SMN2*-Transgens nicht dem des Menschen, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass in dem Mausmodell wichtige regulatorische Sequenzen oder bestimmte Enzyme fehlen, die für die Aufrechterhaltung des Methylierungsmusters sowie dessen Modulation durch die HDAC-Inhibitoren nötig sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung der Expression des *LT-SMN2* durch HDAC-Inhibitoren nicht von der Demethylierung durch diese Wirkstoffe abhängt. Auch für andere Gene konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung durch HDAC-Inhibitoren nicht mit einer Demethylierung des Promotorbereichs einhergeht. So zeigte sich beispielsweise bei der Aktivierung der Expression des Gens für den Östrogen Rezeptor alpha (ER), welche durch Hypermethylierung abgeschaltet ist, mittels LBH589 keine Demethylierung des ER-Promotors (Zhou, et al. 2007).

6.10 Die Inhibition der *LT-SMN2*-Expression wird durch MeCP2 vermittelt

Um zu untersuchen wie die Methylierung die Expression von der ersten Transkriptionsstartstelle aus reguliert, wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt: Zum Einen wurde die Promotorregion von Position -326 bis -266 relativ zum ATG mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) Analysen auf die Bindung von methylierungsabhängigen und unabhängigen Transkriptionsfaktoren untersucht, zum Anderen wurde die Promotorregion von Position -631 bis +59 durch ChIP-Analysen mit einem MeCP2-Antikörper genauer analysiert. Obwohl die EMSA-Experimente keinen Nachweis für die Bindung eines der untersuchten Transkriptionsfaktoren erbringen konnten, zeigten die ChIP-Analysen eine methylierungsabhängige Bindung des MeCP2-Proteins an die 286 bp große Promotorregion von Position -349 bis -63 relativ zum ATG der *SMN*-Genkopien. Diese Region enthält sowohl die drei Transkriptionsstartpunkte des *SMN2*-Gens an den Positionen -296, -242 und -163 als auch die differenziell methylierten CpG-Dinukleotide an den Positionen -296 und -290. Der *knock-down* von MeCP2 führte zu einer Steigerung der *LT-SMN2*-Expression in ML17 Zellen. Es ist bekannt, dass MeCP2 Histondeacetylasen an die Promotorregion rekrutieren kann, an die es bindet (Jones, et al. 1998, Nan, et al. 1998). Dies und die gezeigten Ergebnisse lassen

vermuten, dass MeCP2 an der Hemmung der Expression des *SMN2*-Gens durch DNA-Methylierung beteiligt ist.

6.11 Der *knock-down* einzelner Histondeacetylasen reicht nicht aus, um die Expression vom ersten Transkriptionsstartpunkt zu steigern

Die Analyse der Auswirkung des *knock-downs* der einzelnen HDACs oder der gesamten Klasse I der „klassischen“ HDACs sollte näheren Aufschluss darüber erbringen, welche Histondeacetylasen an der Regulation der *LT-SMN2*-Expression beteiligt sind. Der *knock-down* der einzelnen HDACs hatte allerdings nur für HDAC6 und HDAC8 eine geringe bis mäßige Induktion der *LT-SMN2*-Expression zur Folge. Der *knock-down* der übrigen HDAC Isoenzyme zeigte keine Wirkung. Der *knock-down* der gesamten HDAC Klasse I hatte etwa den gleichen Effekt wie der *knock-down* des MeCP2. Durch gleichzeitigen *knock-down* der Klasse I HDACs und MeCP2 konnte keine weitere Steigerung der *LT-SMN2*-Expression erreicht werden, allerdings war die Effizienz des *knock-downs* hier auch deutlich schlechter als in Versuchen mit den einzelnen Isoenzymen. Durch die Verwendung der siRNAs konnten aber niemals die gleichen Effekte erreicht werden wie durch die panHDAC-Inhibitoren. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass (im Gegensatz zu der Verwendung von HDAC-Inhibitoren) nach dem *knock-down* nicht die gesamte HDAC Aktivität gehemmt ist. Außerdem ist bekannt, dass HDAC Isoenzyme in Zelllinien eine teilweise redundante Aktivität haben (Bolden, et al. 2006). Der *knock-down* einer einzelnen Histondeacetylase kann daher vermutlich durch die Aktivität eines anderen Isoenzyms ausgeglichen werden.

Die durch MeCP2 rekrutierten Chromatin modifizierenden Komplexe bzw. HDAC-Isoenzyme konnten hier leider nicht identifiziert werden. Da aber die isoenzymspezifischen HDAC-Inhibitoren MS-275 und VPA in den verwendeten Konzentrationen die Histondeacetylasen HDAC1, HDAC2, HDAC3 sowie HDAC9 (nur MS-275) hemmen (Vergl. Tabelle 1) und kein Effekt auf die Expression des *LT-SMN2*-Transkripts haben, scheint der Effekt der panHDAC-Inhibitoren auf die Hemmung der übrigen „klassischen“ HDACs (HDACs 4-8, 10, 11) zurückzuführen zu sein. Weitere Versuche, beispielsweise mit Inhibitoren der Klasse II HDACs oder mit HDAC-Inhibitoren, die nur ein HDAC-Isoenzym inhibieren (Balasubramanian, et al.

2008, Kawada, et al. 2009) können hier helfen, die für die Aktivierung der *SMN2*-Expression wichtigen HDAC-Isoenzyme zu identifizieren und die Rolle von MeCP2 und der HDAC-Isoenzyme in der Regulation der *SMN2*-Expression zu verstehen. Diese Kenntnisse können dann genutzt werden, um möglichst spezifische und wirksame Substanzen zur Behandlung der SMA zu entwickeln.

7 Zusammenfassung

Die wichtigsten Mechanismen der epigenetischen Genregulation sind die Methylierung von DNA an Cytosinbasen in CpG-Dinukleotiden und die Modifikation von Histonen durch Acetylierung, Methylierung, Sumoylierung und Ubiquitinierung. Die DNA-Methylierung und die Acetylierung von Histonen sind dabei nicht nur getrennt wirkende Repressoren der Transkription, welche die Zugänglichkeit der DNA oder des Chromatins verändern, sondern diese Mechanismen interagieren miteinander. So konnte gezeigt werden, dass die Methylierung der CpG-Dinukleotide die Bindung von Transkriptionsfaktoren mit einer MBD (*methyl-CpG-binding domain*) wie MeCP2 ermöglicht. Diese rekrutieren wiederum Proteinkomplexe mit Histondeacetylaseaktivität an den Promotor. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Rolle der epigenetischen Regulation des *SMN2*-Gens in der Pathogenese der spinalen Muskelatrophie (SMA) näher untersucht werden.

Die proximale spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine autosomal rezessiv erbliche neuromuskuläre Erkrankung, die durch die Degeneration von α -Motoneuronen im Rückenmark gekennzeichnet ist. Als molekulare Ursache konnten Deletionen/Mutationen des *survival of motor neuron gene 1* (*SMN1*) gefunden werden. Der Schweregrad der Erkrankung wird hauptsächlich durch die Anzahl der *SMN2*-Genkopien bestimmt. Je größer die Anzahl an *SMN2*-Kopien, desto wahrscheinlicher ist ein milderer Verlauf der Erkrankung. Das *SMN2*-Gen bildet auf Grund einer Mutation, die das Spleißen der prä-mRNA beeinflusst, nur etwa 10% des funktionellen Volllänge-SMN-Proteins im Vergleich zum *SMN1*-Gen. Die Korrelation des Phänotyps mit der Anzahl an *SMN2*-Genkopien ist nicht absolut: So können Patienten mit der gleichen Anzahl an *SMN2*-Genkopien an unterschiedlichen Schweregraden der SMA erkranken. Daher ist zu vermuten, dass die *SMN2*-Genkopien bei diesen Patienten funktionell nicht äquivalent sind.

Durch eigene Vorarbeiten und die Quantifizierung der Methylierung mittels Pyrosequenzierung konnte gezeigt werden, dass die Promotorregionen der *SMN*-Gene vier CpG-Inseln enthält (^{SMN}CGI 1 bis 4). Die Quantifizierung der *SMN2*-Methylierung in SMA-Fibroblasten und der *SMN1*- sowie *SMN2*-Methylierung in Blutproben von SMA-Patienten zeigte, dass ^{SMN}CGI 1 und 4 hypermethyliert sind

(>70% Methylierung). ^{SMN}CGI 2 hat eine Länge von 223 bp und einen GC-Gehalt von 58,3%; es reicht von Position -469 bis -247 relativ zum Translationsstartpunkt (ATG) der *SMN*-Gene. Dieses CGI enthält den ersten Transkriptionsstartpunkt der *SMN*-Genkopien und ist nur teilweise methyliert. ^{SMN}CGI 3 ist mit 446 bp die größte der vier CpG-reichen Regionen und erstreckt sich von Position -151 bis +295 (GC-Gehalt: 62,1%). Für diese Region konnten nur sehr geringe Methylierungswerte festgestellt werden; es ist daher die einzige „klassische“ CpG-Insel im Promotor der *SMN*-Genkopien.

Der Vergleich der Methylierung der *SMN2*-Genkopien im Blut von *SMN1*-deletierten SMA Typ I und Typ III Patienten, die 2 *SMN2*-Genkopien aufweisen, zeigte unter anderem an den Positionen -296 und -290 im ^{SMN2}CGI 2 signifikante Methylierungsunterschiede, die mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren. Diese Unterschiede konnten auch in SMA-Fibroblasten mit 2 *SMN2*-Genkopien gefunden werden, die von Patienten mit unterschiedlichem SMA-Schweregrad stammen (Typ I und Typ IIIa/b). Interessanterweise entspricht die Position -296 genau dem ersten Transkriptionsstartpunkt der *SMN*-Genkopien. Die Transkriptanalyse mittels quantitativer *real-time* PCR in den SMA-Fibroblasten zeigte eine inverse Korrelation der Expression von diesem Transkriptionsstartpunkt (*LT-SMN2*) mit der Methylierung an den Positionen -296 und 290. Die Expression dieses *SMN2*-Transkripts wird also durch DNA-Methylierung gehemmt. Mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) Analysen konnten DNA-Proteinkomplexe im Bereich des ersten Transkriptionsstartpunktes nachgewiesen werden. Durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) konnte gezeigt werden, dass die Stilllegung der Expression mittels DNA-Methylierung durch das MeCP2-Protein vermittelt wird, welches methylierungsabhängig in der kritischen Promotorregion bindet. Die Analyse der Expression des *LT-SMN2* in humanem embryonalem Gewebe und in Geweben von SMA-Mausmodellen zeigte eine stärkere Expression des *LT-SMN2* in neuronalen Geweben. Allerdings zeigten die untersuchten SMA-Mausmodelle im ^{SMN2}CGI 2 deutliche weniger Methylierung als die untersuchten humanen Proben. Diese Ergebnisse geben Anlass zu der Vermutung, dass die Methylierung an den Positionen -296 und -290 des *SMN2*-Gens in neuronalem Gewebe funktionell relevant ist und so den Krankheitsverlauf der SMA moduliert.

Die Untersuchungen mit verschiedenen HDAC Inhibitoren in Fibroblasten und organotypischen Hirnschnittkulturen zeigten, dass nur panHDAC-Inhibitoren wie Vorinostat (SAHA) oder Romidepsin (FK-228) in der Lage sind die Stilllegung der *SMN2*-Transkription wirksam zu umgehen. Die isoenzymspezifischen HDAC-Inhibitoren Valproinsäure (VPA) und Phenylbutyrat, welche sich derzeit in klinischen Untersuchungen zur Behandlung der SMA befinden, zeigten hingegen nur eine geringe Wirksamkeit in der Induktion der Expression. Durch siRNA Experimente konnte gezeigt werden, dass die Expression des *SMN2*-Gens nicht durch den *knock-down* einzelner HDAC-Isoenzyme gesteigert werden kann. Der *knock-down* von *MeCP2*, *E2F1*, der gesamten *HDAC*-Klasse I Gene sowie der *HDAC*-Klasse I Gene und *MeCP2* bewirkte jeweils eine Steigerung der *LT-SMN2*-Expression, aber nur durch den *knock-down* von *E2F1* konnte auch die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge signifikant gesteigert werden.

Als zukünftige SMA-Therapeutika kommen daher vor allem panHDAC-Inhibitoren wie Vorinostat in Frage, falls die bisher in klinischer Testung befindlichen Wirkstoffe (VPA, PB) keine zufriedenstellenden Ergebnisse zeigen. Die gezeigten Ergebnisse deuten an, dass die DNA-Methylierung für den Krankheitsverlauf und die pharmakologische *SMN2*-Genaktivierung von Bedeutung sein kann, was für zukünftige Therapieprogramme von Interesse ist.

8 **Abstract**

The expression of eukaryotic genes is not only regulated by their promotor sequence but also by epigenetic factors. The most important factors of epigenetic gene regulation are DNA methylation at cytosins in CpG-dinucleotides and acetylation of the histones around which the DNA is wrapped in the nucleus. These two fundamental mechanisms of epigenetic gene regulation have shown to be interlinked. Methylation of CpG-dinucleotides for example enables the binding of the MBD (methyl-CpG-binding domain) transcription factors like MeCP2, which are able to recruit chromatin remodelling complexes with HDAC activity to the promotor and represses the transcriptional activity via the acetylation of histones. During this thesis the epigenetic *SMN2* gene regulation and its role in the pathogenesis of spinal muscular atrophy (SMA) were analysed in detail.

Proximal spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive inherited neuromuscular disorder, which is characterized by the degeneration of α -motoneurons in the anterior horns of the spinal cord. The molecular cause of the disease are homozygous deletions of the *survival motor neuron gene 1* (*SMN1*) in 96% of patients, intragenic mutations of *SMN1* are rare. Within the SMA region on chromosome 5q13 the human *survival motor neuron gene* exists in two copies *SMN1* and *SMN2* which encode identical proteins and are ubiquitously expressed. Due to a C to T transition within exon7 the *SMN2* gene copy produces only about 10% of fulllength transcripts and protein compared to *SMN1*. The SMA disease severity correlates with the *SMN2* copy number; the higher the number of *SMN2* copies the more likely a milder phenotype is. However this correlation is not absolute, suggesting that the *SMN2* gene copies are functionally not equivalent or the existence of other factors which can modulate the disease progression.

My preliminary work and the quantification of methylation via pyrosequencing showed, that the promotor region of the *SMN* genes contains four CpG-islands (^{*SMN*}CGI 1-4). The analysis of the *SMN2* methylation in blood samples and fibroblast as well as the *SMN1* methylation analysis in blood samples revealed that ^{*SMN*}CGI 1 and ^{*SMN*}CGI 4 are hypermethylated (>70%). The second CpG island (^{*SMN*}CGI 2) with a GC content of 58.3% has a size of 223 nt and ranges from position -469 to -247 relative to the translational start site (ATG). This CpG island contains the first

transcription start site (TSS) of the *SMN* gene copies and analysis revealed it to be only partially methylated. ^{*SMN*}CGI 3 is the largest of the four CpG-islands with a size of 446 nt from position -151 to +295 and a GC-content of 62.1%. This CpG island showed only very low methylation levels and therefore is the only 'classical' CGI in the *SMN* promotor region.

The comparison of methylation levels in DNA from blood and fibroblast between severely affected SMA type I patients and milder affected type III patients revealed significant lower methylation levels at two adjacent sites (-296 and -290) in the type III patients. Interestingly, the CpG dinucleotide at position -296 co-localizes with the first TSS indicating that DNA methylation at this position is linked with transcriptional silencing of expression from this TSS (*LT-SMN2*). Analysis in fibroblasts revealed an inverse correlation between *LT-SMN2* expression and methylation at positions -296 and -290. The analysis of the promotor region surrounding the first TSS by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) analysis revealed the sequence specific binding of protein to this region, which was not influenced by methylation. By using chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis I was able to show, that silencing of *LT-SMN2* transcription via methylation is mediated by the MeCP2 protein, which binds the critical promotor region in a methylation dependent manner. The analysis of *LT-SMN2* levels in human embryonic tissues and murine tissues from SMA mouse models revealed a higher expression of *LT-SMN2* in neuronal than in non neuronal tissues. These results suggest that methylation at position -296 and -290 is functionally relevant and modulates the SMA disease severity in the presence of identical *SMN2* copy numbers.

Analysis with different HDAC-inhibitors (HDACis) in SMA fibroblasts and human organotypic hippocampal brain slice cultures (OHSCs) revealed that panHDACis like *Vorinostat* (SAHA) or *Romidepsin* (FK-228) are able to bypass *SMN2* gene silencing by DNA methylation, whereas others like valproic acid (VPA) or phenylbutyrate which are under clinical investigation for SMA therapy do not. Taken together these results show, that DNA methylation seems to be important for the course of the disease as well as for pharmacological *SMN2* gene activation, which might be interesting for future therapy regimens. Especially panHDACis are more potent in *SMN2* gene activation and good new candidates for the treatment of SMA, if the drugs tested so far do not show the desired results.

9 Publikationsverzeichnis

9.1 Originalarbeiten:

Coras R, Hölsken A, Seufert S, **Hauke J**, Eyüpoglu IY, Reichel M, Tränkle C, Siebzehrnühl FA, Buslei R, Blümcke I, Hahnen E (2007): The PPAR-gamma agonist troglitazone inhibits TGF- β mediated glioma cell migration and brain invasion. *Mol Cancer Ther*, Jun;6(6):1745-54.

Hauke J, Riessland M, Lunke S, Eyupoglu IY, Blumcke I, El-Osta A, Wirth B, Hahnen E (2009): Survival motor neuron gene 2 silencing by DNA methylation correlates with spinal muscular atrophy disease severity and can be bypassed by histone deacetylase inhibition. *Hum Mol Genet.*, Jan 15;18(2) :304-17.

Kobow K, Jeske I, Hildebrandt M, **Hauke J**, Hahnen E, Buslei R, Buchfelder M, Weigel D, Stefan H, Kasper B, Pauli E, Blümcke I (2009): Increased Reelin Promotor methylation associates with granule cell dispersion in human temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol.*, Apr;68(4):356-64.

Garbes L, Riessland M, Hölker I, Heller R, **Hauke J**, Tränkle C, Coras R, Blümcke I, Hahnen E, Wirth B (2009): LBH589 induces up to 10-fold SMN protein levels by several independent mechanisms and is effective even in cells from SMA patients non-responsive to valproate. *Hum Mol Genet.* 2009 Jul 7. [Epub ahead of print]

9.2 Übersichtsartikel:

Hahnen E, **Hauke J**, Tränkle C, Eyüpoglu IY, Wirth B, Blümcke I (2008): Histone deacetylase inhibitors: possible implications for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs.* Feb;17(2):169-84.

9.3 Eingereichte Arbeiten

Behrens MI, Brüggemann N, Chana P, Venegas P, Kägi M, Parrao T, Orellana P, Garrido C, Rojas CV, **Hauke J**, Hahnen E, González R, Seleme N, Fernández V, Binkofski, Kömpf D, Kubisch C, Hagenah J, Klein C, Ramirez A, Clinical spectrum of Kufor Rakeb Syndrome in the Chilean kindred with ATP13A2 mutations. *Movement Disord, submitted.*

9.4 Kongressbeiträge

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) in Heidelberg 2006 Vortrag: **Hauke J.**, Schwingel E, Hahnen E, Wirth B, Enhancement of *SMN2* gene expression by the DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine Medgen, Band 18, abstract W10 06 ; GfH-Tagung, Heidelberg, 2006

Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft für Humangenetik (ASHG) in New Orleans 2007 Poster: Hahnen E, **Hauke J.**, Wirth B, Enhancement of *SMN2* gene expression by the DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) in Bonn 2007 Poster: **Hauke J.**, Hahnen E., Wirth B. *SMN2* gene promotor methylation correlates with the spinal muscular atrophy (SMA) disease severity Medgen Band 19, abstract P179; GfH-Tagung, Bonn, 2007

20th course in medical genetics der European Genetics Foundation in Bertinoro 2007 Poster: **Hauke J.**, Hahnen E., Wirth B. *SMN2* gene promotor methylation correlates with the spinal muscular atrophy (SMA) disease severity

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) in Hannover 2008 Poster: **Hauke J.**, Hahnen E., Wirth B. *SMN2* gene Promotor methylation: Implications for progression and therapy of Spinal Muscular Atrophy (SMA) Medgen Band 20, abstract P308; GfH-Tagung, Hannover, 2008

18th meeting of the European Neurological Society (ENS) in Nizza 2008 Poster: **Hauke J.**, Hahnen E., Wirth B. *SMN2* gene Promotor methylation: Implications for progression and therapy of Spinal Muscular Atrophy (SMA). Journal of Neurology Volume 255, Supplement 2 / Juni 2008 abstract P275

13th Annual International Spinal Muscular Atrophy Research Group Meeting in Cincinnati 2009 Poster: **Hauke J.**, Wirth B., Hahnen E. *Survival Motor Neuron Gene 2* Silencing by DNA Methylation Correlates with Spinal Muscular Atrophy Disease Severity and can be Bypassed by Histone Deacetylase Inhibition

Epigenetics World Congress in Berlin 2009 Poster: **Hauke J.**, Wirth B., Hahnen E. *Survival Motor Neuron Gene 2* Silencing by DNA Methylation Correlates with Spinal Muscular Atrophy Disease Severity and can be Bypassed by Histone Deacetylase Inhibition

10 Literaturverzeichnis

1. Andreassi, C., Angelozzi, C., Tiziano, F.D., Vitali, T., De Vincenzi, E., Boninsegna, A., Villanova, M., Bertini, E., Pini, A., Neri, G. *et al.* (2004) Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*, **12**, 59-65.
2. Andreassi, C., Jarecki, J., Zhou, J., Coover, D.D., Monani, U.R., Chen, X., Whitney, M., Pollok, B., Zhang, M., Androphy, E. *et al.* (2001) Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet*, **10**, 2841-9.
3. Angelozzi, C., Borgo, F., Tiziano, F.D., Martella, A., Neri, G. and Brahe, C. (2008) Salbutamol increases SMN mRNA and protein levels in spinal muscular atrophy cells. *J Med Genet*, **45**, 29-31.
4. Appanah, R., Dickerson, D.R., Goyal, P., Groudine, M. and Lorincz, M.C. (2007) An unmethylated 3' promoter-proximal region is required for efficient transcription initiation. *PLoS Genet*, **3**, e27.
5. Baccon, J., Pellizzoni, L., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2002) Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem*, **277**, 31957-62.
6. Balasubramanian, S., Ramos, J., Luo, W., Sirisawad, M., Verner, E. and Buggy, J.J. (2008) A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia*, **22**, 1026-34.
7. Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, **384**, 641-3.
8. Baughan, T., Shababi, M., Coady, T.H., Dickson, A.M., Tullis, G.E. and Lorson, C.L. (2006) Stimulating full-length SMN2 expression by delivering bifunctional RNAs via a viral vector. *Mol Ther*, **14**, 54-62.
9. Baughan, T.D., Dickson, A., Osman, E.Y. and Lorson, C.L. (2009) Delivery of bifunctional RNAs that target an intronic repressor and increase SMN levels in an animal model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **18**, 1600-11.
10. Bird, A. (1992) The essentials of DNA methylation. *Cell*, **70**, 5-8.
11. Bird, A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, **321**, 209-13.
12. Boda, B., Mas, C., Giudicelli, C., Nepote, V., Guimiot, F., Levacher, B., Zvara, A., Santha, M., LeGall, I. and Simonneau, M. (2004) Survival motor neuron SMN1 and SMN2 gene promoters: identical sequences and differential expression in neurons and non-neuronal cells. *Eur J Hum Genet*, **12**, 729-37.
13. Bolden, J.E., Peart, M.J. and Johnstone, R.W. (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 769-84.
14. Boyes, J. and Bird, A. (1991) DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*, **64**, 1123-34.
15. Boyes, J. and Bird, A. (1992) Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *Embo J*, **11**, 327-33.
16. Brahe, C., Servidei, S., Zappata, S., Ricci, E., Tonali, P. and Neri, G. (1995) Genetic homogeneity between childhood-onset and adult-onset autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet*, **346**, 741-2.

17. Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A. and Cedar, H. (1994) Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*, **371**, 435-8.
18. Brichta, L., Hofmann, Y., Hahnen, E., Siebzehnruhl, F.A., Raschke, H., Blumcke, I., Eyupoglu, I.Y. and Wirth, B. (2003) Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **12**, 2481-9.
19. Brichta, L., Holker, I., Haug, K., Klockgether, T. and Wirth, B. (2006) In vivo activation of SMN in spinal muscular atrophy carriers and patients treated with valproate. *Ann Neurol*, **59**, 970-5.
20. Brownell, J.E. and Allis, C.D. (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 176-84.
21. Brueckner, B. and Lyko, F. (2004) DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 551-4.
22. Brzustowicz, L.M., Lehner, T., Castilla, L.H., Penchaszadeh, G.K., Wilhelmsen, K.C., Daniels, R., Davies, K.E., Leppert, M., Ziter, F., Wood, D. *et al.* (1990) Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature*, **344**, 540-1.
23. Cairns, P. (2009) 5'-azacytidine expression arrays. *Methods Mol Biol*, **507**, 165-74.
24. Cartegni, L., Hastings, M.L., Calarco, J.A., de Stanchina, E. and Krainer, A.R. (2006) Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet*, **78**, 63-77.
25. Cartegni, L. and Krainer, A.R. (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet*, **30**, 377-84.
26. Carvalho, T., Almeida, F., Calapez, A., Lafarga, M., Berciano, M.T. and Carmo-Fonseca, M. (1999) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J Cell Biol*, **147**, 715-28.
27. Chan, T.L., Yuen, S.T., Kong, C.K., Chan, Y.W., Chan, A.S., Ng, W.F., Tsui, W.Y., Lo, M.W., Tam, W.Y., Li, V.S. *et al.* (2006) Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*, **38**, 1178-83.
28. Chang, J.G., Hsieh-Li, H.M., Jong, Y.J., Wang, N.M., Tsai, C.H. and Li, H. (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9808-13.
29. Chang, Q., Khare, G., Dani, V., Nelson, S. and Jaenisch, R. (2006) The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron*, **49**, 341-8.
30. Charroux, B., Pellizzoni, L., Parkinson, R.A., Shevchenko, A., Mann, M. and Dreyfuss, G. (1999) Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J Cell Biol*, **147**, 1181-94.
31. Charroux, B., Pellizzoni, L., Parkinson, R.A., Yong, J., Shevchenko, A., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2000) Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J Cell Biol*, **148**, 1177-86.
32. Chen, Q., Baird, S.D., Mahadevan, M., Besner-Johnston, A., Farahani, R., Xuan, J., Kang, X., Lefebvre, C., Ikeda, J.E., Korneluk, R.G. *et al.* (1998)

- Sequence of a 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP. *Genomics*, **48**, 121-7.
33. Cobben, J.M., van der Steege, G., Grootsholten, P., de Visser, M., Scheffer, H. and Buys, C.H. (1995) Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*, **57**, 805-8.
 34. Cooper, D.N. and Krawczak, M. (1989) Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum Genet*, **83**, 181-8.
 35. Coover, D.D., Le, T.T., McAndrew, P.E., Strasswimmer, J., Crawford, T.O., Mendell, J.R., Coulson, S.E., Androphy, E.J., Prior, T.W. and Burghes, A.H. (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **6**, 1205-14.
 36. Craig, J.M. and Bickmore, W.A. (1994) The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nat Genet*, **7**, 376-82.
 37. Cross, S.H., Meehan, R.R., Nan, X. and Bird, A. (1997) A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet*, **16**, 256-9.
 38. Cusco, I., Barcelo, M.J., Rojas-Garcia, R., Illa, I., Gamez, J., Cervera, C., Pou, A., Izquierdo, G., Baiget, M. and Tizzano, E.F. (2006) SMN2 copy number predicts acute or chronic spinal muscular atrophy but does not account for intrafamilial variability in siblings. *J Neurol*, **253**, 21-5.
 39. Deng, V., Matagne, V., Banine, F., Frerking, M., Ohliger, P., Budden, S., Pevsner, J., Dissen, G.A., Sherman, L.S. and Ojeda, S.R. (2007) FXYD1 is an MeCP2 target gene overexpressed in the brains of Rett syndrome patients and Mecp2-null mice. *Hum Mol Genet*, **16**, 640-50.
 40. Detich, N., Bovenzi, V. and Szyf, M. (2003) Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem*, **278**, 27586-92.
 41. Dickson, A., Osman, E. and Lorson, C. (2008) A Negatively-Acting Bifunctional RNA Increases Survival Motor Neuron in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther*.
 42. DiDonato, C.J., Morgan, K., Carpten, J.D., Fuerst, P., Ingraham, S.E., Prescott, G., McPherson, J.D., Wirth, B., Zerres, K., Hurko, O. *et al.* (1994) Association between Ag1-CA alleles and severity of autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*, **55**, 1218-29.
 43. Doerfler, W. (1983) DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem*, **52**, 93-124.
 44. Doerfler, W., Toth, M., Kochanek, S., Achten, S., Freisem-Rabien, U., Behn-Krappa, A. and Orend, G. (1990) Eukaryotic DNA methylation: facts and problems. *FEBS Lett*, **268**, 329-33.
 45. Dong, E., Guidotti, A., Grayson, D.R. and Costa, E. (2007) Histone hyperacetylation induces demethylation of reelin and 67-kDa glutamic acid decarboxylase promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 4676-81.
 46. Doran, B., Gherbesi, N., Hendricks, G., Flavell, R.A., Davis, R.J. and Gangwani, L. (2006) Deficiency of the zinc finger protein ZPR1 causes neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7471-5.
 47. Dupont, J.M., Tost, J., Jammes, H. and Gut, I.G. (2004) De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem*, **333**, 119-27.
 48. Duvic, M. and Vu, J. (2007) Vorinostat: a new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs*, **16**, 1111-20.

49. Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A. and Svendsen, C.N. (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, **457**, 277-80.
50. Echaniz-Laguna, A., Miniou, P., Bartholdi, D. and Melki, J. (1999) The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements. *Am J Hum Genet*, **64**, 1365-70.
51. Eckhardt, F., Lewin, J., Cortese, R., Rakyan, V.K., Attwood, J., Burger, M., Burton, J., Cox, T.V., Davies, R., Down, T.A. *et al.* (2006) DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet*, **38**, 1378-85.
52. Emiliani, S., Fischle, W., Van Lint, C., Al-Abed, Y. and Verdin, E. (1998) Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2795-800.
53. Esteller, M., Hamilton, S.R., Burger, P.C., Baylin, S.B. and Herman, J.G. (1999) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*, **59**, 793-7.
54. Eyupoglu, I.Y., Hahnen, E., Buslei, R., Siebzehnruhl, F.A., Savaskan, N.E., Luders, M., Trankle, C., Wick, W., Weller, M., Fahlbusch, R. *et al.* (2005) Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) has potent anti-glioma properties in vitro, ex vivo and in vivo. *J Neurochem*, **93**, 992-9.
55. Eyupoglu, I.Y., Hahnen, E., Heckel, A., Siebzehnruhl, F.A., Buslei, R., Fahlbusch, R. and Blumcke, I. (2005) Malignant glioma-induced neuronal cell death in an organotypic glioma invasion model. Technical note. *J Neurosurg*, **102**, 738-44.
56. Eyupoglu, I.Y., Hahnen, E., Savaskan, N.E., Siebzehnruhl, F.A., Buslei, R., Trankle, C., Wick, W., Fahlbusch, R. and Blumcke, I. (2006) Experimental therapy of malignant gliomas using the inhibitor of class I histone deacetylases MS-275. *Molecular Cancer Therapeutics*, *accepted*.
57. Feldkotter, M., Schwarzer, V., Wirth, R., Wienker, T.F. and Wirth, B. (2002) Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*, **70**, 358-68.
58. Fillion, G.J., Zhenilo, S., Salozhin, S., Yamada, D., Prokhortchouk, E. and Defossez, P.A. (2006) A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol*, **26**, 169-81.
59. Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M. and Tsai, L.H. (2007) Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*, **447**, 178-82.
60. Fischer, U., Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell*, **90**, 1023-9.
61. Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J. *et al.* (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10604-9.
62. Gangwani, L., Mikrut, M., Theroux, S., Sharma, M. and Davis, R.J. (2001) Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein. *Nat Cell Biol*, **3**, 376-83.
63. Garbes, L., Riessland, M., Holker, I., Heller, R., Hauke, J., Trankle, C., Coras, R., Blumcke, I., Hahnen, E. and Wirth, B. (2009) LBH589 induces up to 10-fold SMN protein levels by several independent mechanisms and is effective even in cells from SMA patients non-responsive to valproate. *Hum Mol Genet*.

64. Germain-Desprez, D., Brun, T., Rochette, C., Semionov, A., Rouget, R. and Simard, L.R. (2001) The SMN genes are subject to transcriptional regulation during cellular differentiation. *Gene*, **279**, 109-17.
65. Gilliam, T.C., Brzustowicz, L.M., Castilla, L.H., Lehner, T., Penchaszadeh, G.K., Daniels, R.J., Byth, B.C., Knowles, J., Hislop, J.E., Shapira, Y. *et al.* (1990) Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature*, **345**, 823-5.
66. Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P.G. *et al.* (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J*, **20**, 6969-78.
67. Grayson, D.R., Jia, X., Chen, Y., Sharma, R.P., Mitchell, C.P., Guidotti, A. and Costa, E. (2005) Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9341-6.
68. Grondard, C., Biondi, O., Armand, A.S., Lecolle, S., Della Gaspera, B., Pariset, C., Li, H., Gallien, C.L., Vidal, P.P., Chanoine, C. *et al.* (2005) Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci*, **25**, 7615-22.
69. Grozinger, C.M., Hassig, C.A. and Schreiber, S.L. (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4868-73.
70. Gubitz, A.K., Mourelatos, Z., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2002) Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J Biol Chem*, **277**, 5631-6.
71. Hahnen, E., Eyupoglu, I.Y., Brichta, L., Haastert, K., Trankle, C., Siebzehrubl, F.A., Riessland, M., Holker, I., Claus, P., Romstock, J. *et al.* (2006) In vitro and ex vivo evaluation of second generation histone deacetylase inhibitors for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Neurochem*.
72. Hahnen, E., Forkert, R., Marke, C., Rudnik-Schoneborn, S., Schonling, J., Zerres, K. and Wirth, B. (1995) Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum Mol Genet*, **4**, 1927-33.
73. Hahnen, E., Hauke, J., Trankle, C., Eyupoglu, I.Y., Wirth, B. and Blumcke, I. (2008) Histone deacetylase inhibitors: possible implications for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs*, **17**, 169-84.
74. Hahnen, E., Schonling, J., Rudnik-Schoneborn, S., Raschke, H., Zerres, K. and Wirth, B. (1997) Missense mutations in exon 6 of the survival motor neuron gene in patients with spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mol Genet*, **6**, 821-5.
75. Heier, C.R. and DiDonato, C.J. (2009) Translational readthrough by the aminoglycoside geneticin (G418) modulates SMN stability in vitro and improves motor function in SMA mice in vivo. *Hum Mol Genet*, **18**, 1310-22.
76. Helmken, C., Hofmann, Y., Schoenen, F., Oprea, G., Raschke, H., Rudnik-Schoneborn, S., Zerres, K. and Wirth, B. (2003) Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1. *Hum Genet*, **114**, 11-21.
77. Hendrich, B. and Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*, **18**, 6538-47.
78. Hockly, E., Richon, V.M., Woodman, B., Smith, D.L., Zhou, X., Rosa, E., Sathasivam, K., Ghazi-Noori, S., Mahal, A., Lowden, P.A. *et al.* (2003)

- Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2041-6.
79. Hofmann, Y., Lorson, C.L., Stamm, S., Androphy, E.J. and Wirth, B. (2000) Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9618-23.
 80. Holler, M., Westin, G., Jiricny, J. and Schaffner, W. (1988) Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev*, **2**, 1127-35.
 81. Horike, S., Cai, S., Miyano, M., Cheng, J.F. and Kohwi-Shigematsu, T. (2005) Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet*, **37**, 31-40.
 82. Hsieh-Li, H.M., Chang, J.G., Jong, Y.J., Wu, M.H., Wang, N.M., Tsai, C.H. and Li, H. (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, **24**, 66-70.
 83. Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-80.
 84. Jiricny, J. (1996) Mismatch repair and cancer. *Cancer Surv*, **28**, 47-68.
 85. Jones, K.W., Gorzynski, K., Hales, C.M., Fischer, U., Badbanchi, F., Terns, R.M. and Terns, M.P. (2001) Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Biol Chem*, **276**, 38645-51.
 86. Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A.P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, **19**, 187-91.
 87. Jones, P.L. and Wolffe, A.P. (1999) Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol*, **9**, 339-47.
 88. Jung, M., Brosch, G., Kolle, D., Scherf, H., Gerhauser, C. and Loidl, P. (1999) Amide analogues of trichostatin A as inhibitors of histone deacetylase and inducers of terminal cell differentiation. *J Med Chem*, **42**, 4669-79.
 89. Juttermann, R., Li, E. and Jaenisch, R. (1994) Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11797-801.
 90. Kaludov, N.K. and Wolffe, A.P. (2000) MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1921-8.
 91. Kashima, T. and Manley, J.L. (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, **34**, 460-3.
 92. Kashima, T., Rao, N., David, C.J. and Manley, J.L. (2007) hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum Mol Genet*, **16**, 3149-59.
 93. Kashima, T., Rao, N. and Manley, J.L. (2007) An intronic element contributes to splicing repression in spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 3426-31.

94. Kato, M., Miura, A., Bender, J., Jacobsen, S.E. and Kakutani, T. (2003) Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, **13**, 421-6.
95. Kawada, J., Zou, P., Mazitschek, R., Bradner, J.E. and Cohen, J.I. (2009) Tubacin kills epstein-barr virus (EBV)-Burkitt lymphoma cells by inducing reactive oxygen species and EBV lymphoblastoid cells by inducing apoptosis. *J Biol Chem*, **284**, 17102-9.
96. Kernochan, L.E., Russo, M.L., Woodling, N.S., Huynh, T.N., Avila, A.M., Fischbeck, K.H. and Sumner, C.J. (2005) The role of histone acetylation in SMN gene expression. *Hum Mol Genet*, **14**, 1171-82.
97. Kouzarides, T. (1999) Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 40-8.
98. Kriaucionis, S., Paterson, A., Curtis, J., Guy, J., Macleod, N. and Bird, A. (2006) Gene expression analysis exposes mitochondrial abnormalities in a mouse model of Rett syndrome. *Mol Cell Biol*, **26**, 5033-42.
99. Kuroda, A., Rauch, T.A., Todorov, I., Ku, H.T., Al-Abdullah, I.H., Kandeel, F., Mullen, Y., Pfeifer, G.P. and Ferreri, K. (2009) Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS One*, **4**, e6953.
100. Landers, J.E., Melki, J., Meininger, V., Glass, J.D., van den Berg, L.H., van Es, M.A., Sapp, P.C., van Vught, P.W., McKenna-Yasek, D.M., Blauw, H.M. *et al.* (2009) Reduced expression of the Kinesin-Associated Protein 3 (KIFAP3) gene increases survival in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 9004-9.
101. Le, T.T., Pham, L.T., Butchbach, M.E., Zhang, H.L., Monani, U.R., Coover, D.D., Gavriline, T.O., Xing, L., Bassell, G.J. and Burghes, A.H. (2005) SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet*, **14**, 845-57.
102. Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M. *et al.* (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, **80**, 155-65.
103. Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G. and Melki, J. (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, **16**, 265-9.
104. Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F. and Bird, A. (1992) Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*, **69**, 905-14.
105. Li, E., Bestor, T.H. and Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, **69**, 915-26.
106. Liang, W.C., Yuo, C.Y., Chang, J.G., Chen, Y.C., Chang, Y.F., Wang, H.Y., Ju, Y.H., Chiou, S.S. and Jong, Y.J. (2008) The effect of hydroxyurea in spinal muscular atrophy cells and patients. *J Neurol Sci*, **268**, 87-94.
107. Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J*, **15**, 3555-65.
108. Liu, Q., Fischer, U., Wang, F. and Dreyfuss, G. (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell*, **90**, 1013-21.
109. Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J. and Wirth, B. (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6307-11.

110. Lorson, C.L., Strasswimmer, J., Yao, J.M., Baleja, J.D., Hahnen, E., Wirth, B., Le, T., Burghes, A.H. and Androphy, E.J. (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet*, **19**, 63-6.
111. Lubin, F.D., Roth, T.L. and Sweatt, J.D. (2008) Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci*, **28**, 10576-86.
112. Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-60.
113. Lutsenko, E. and Bhagwat, A.S. (1999) Principal causes of hot spots for cytosine to thymine mutations at sites of cytosine methylation in growing cells. A model, its experimental support and implications. *Mutat Res*, **437**, 11-20.
114. Majumder, S., Varadharaj, S., Ghoshal, K., Monani, U., Burghes, A.H. and Jacob, S.T. (2004) Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. *J Biol Chem*, **279**, 14803-11.
115. Marks, P.A., Richon, V.M., Miller, T. and Kelly, W.K. (2004) Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res*, **91**, 137-68.
116. Marks, P.A., Richon, V.M. and Rifkind, R.A. (2000) Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 1210-6.
117. Marquis, J., Meyer, K., Angehrn, L., Kampfer, S.S., Rothen-Rutishauser, B. and Schumperli, D. (2007) Spinal muscular atrophy: SMN2 pre-mRNA splicing corrected by a U7 snRNA derivative carrying a splicing enhancer sequence. *Mol Ther*, **15**, 1479-86.
118. Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G. and Sun, Y.E. (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*, **302**, 890-3.
119. Mattis, V.B., Ebert, A.D., Fosso, M.Y., Chang, C.W. and Lorson, C.L. (2009) Delivery of a read-through inducing compound, TC007, lessens the severity of a SMA animal model. *Hum Mol Genet*.
120. Mattis, V.B., Rai, R., Wang, J., Chang, C.W., Coady, T. and Lorson, C.L. (2006) Novel aminoglycosides increase SMN levels in spinal muscular atrophy fibroblasts. *Hum Genet*, **120**, 589-601.
121. McGill, B.E., Bundle, S.F., Yaylaoglu, M.B., Carson, J.P., Thaller, C. and Zoghbi, H.Y. (2006) Enhanced anxiety and stress-induced corticosterone release are associated with increased Crh expression in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18267-72.
122. Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L. and Bird, A.P. (1989) Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell*, **58**, 499-507.
123. Melki, J., Abdelhak, S., Sheth, P., Bachelot, M.F., Burlet, P., Marcadet, A., Aicardi, J., Barois, A., Carriere, J.P., Fardeau, M. *et al.* (1990) Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature*, **344**, 767-8.
124. Melki, J., Sheth, P., Abdelhak, S., Burlet, P., Bachelot, M.F., Lathrop, M.G., Frezal, J. and Munnich, A. (1990) Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet*, **336**, 271-3.
125. Meyer, K., Marquis, J., Trub, J., Nlend Nlend, R., Verp, S., Ruepp, M.D., Imboden, H., Barde, I., Trono, D. and Schumperli, D. (2009) Rescue of a

- severe mouse model for spinal muscular atrophy by U7 snRNA-mediated splicing modulation. *Hum Mol Genet*, **18**, 546-55.
126. Milutinovic, S., D'Alessio, A.C., Detich, N. and Szyf, M. (2007) Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis*, **28**, 560-71.
 127. Monani, U.R., McPherson, J.D. and Burghes, A.H. (1999) Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim Biophys Acta*, **1445**, 330-6.
 128. Monani, U.R., Sendtner, M., Coover, D.D., Parsons, D.W., Andreassi, C., Le, T.T., Jablonka, S., Schrank, B., Rossol, W., Prior, T.W. *et al.* (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **9**, 333-9.
 129. Morgan, H.D., Sutherland, H.G., Martin, D.I. and Whitelaw, E. (1999) Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet*, **23**, 314-8.
 130. Muiznieks, I. and Doerfler, W. (1994) The topology of the promoter of RNA polymerase II- and III-transcribed genes is modified by the methylation of 5'-CG-3' dinucleotides. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2568-75.
 131. Munsat, T.L. and Davies, K.E. (1992) International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord*, **2**, 423-8.
 132. Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. and Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386-9.
 133. Nayak, M.S., Kim, Y.S., Goldman, M., Keirstead, H.S. and Kerr, D.A. (2006) Cellular therapies in motor neuron diseases. *Biochim Biophys Acta*, **1762**, 1128-38.
 134. Newmark, H.L., Lupton, J.R. and Young, C.W. (1994) Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status. *Cancer Lett*, **78**, 1-5.
 135. Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. and Bird, A. (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*, **23**, 58-61.
 136. Nuber, U.A., Kriaucionis, S., Roloff, T.C., Guy, J., Selfridge, J., Steinhoff, C., Schulz, R., Lipkowitz, B., Ropers, H.H., Holmes, M.C. *et al.* (2005) Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet*, **14**, 2247-56.
 137. Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M.F. and Mandel, J.L. (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*, **252**, 1097-102.
 138. Ogino, S. and Wilson, R.B. (2004) Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*, **4**, 15-29.
 139. Oprea, G.E., Krober, S., McWhorter, M.L., Rossoll, W., Muller, S., Krawczak, M., Bassell, G.J., Beattie, C.E. and Wirth, B. (2008) Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science*, **320**, 524-7.
 140. Pane, M., Staccioli, S., Messina, S., D'Amico, A., Pelliccioni, M., Mazzone, E.S., Cuttini, M., Alfieri, P., Battini, R., Main, M. *et al.* (2008) Daily salbutamol in young patients with SMA type II. *Neuromuscul Disord*, **18**, 536-40.
 141. Panning, B. and Jaenisch, R. (1996) DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev*, **10**, 1991-2002.

142. Peddada, S., Yasui, D.H. and LaSalle, J.M. (2006) Inhibitors of differentiation (ID1, ID2, ID3 and ID4) genes are neuronal targets of MeCP2 that are elevated in Rett syndrome. *Hum Mol Genet*, **15**, 2003-14.
143. Pellizzoni, L., Baccon, J., Charroux, B. and Dreyfuss, G. (2001) The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr Biol*, **11**, 1079-88.
144. Pellizzoni, L., Baccon, J., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2002) Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component. *J Biol Chem*, **277**, 7540-5.
145. Phiel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A. and Klein, P.S. (2001) Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*, **276**, 36734-41.
146. Pietrobono, R., Tabolacci, E., Zalfa, F., Zito, I., Terracciano, A., Moscato, U., Bagni, C., Oostra, B., Chiurazzi, P. and Neri, G. (2005) Molecular dissection of the events leading to inactivation of the FMR1 gene. *Hum Mol Genet*, **14**, 267-77.
147. Prior, T.W., Krainer, A.R., Hua, Y., Swoboda, K.J., Snyder, P.C., Bridgeman, S.J., Burghes, A.H. and Kissel, J.T. (2009) A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene. *Am J Hum Genet*, **85**, 408-13.
148. Prokhorchuk, A.V., Aitkhozhina, D.S., Sablina, A.A., Ruzov, A.S. and Prokhorchuk, E.B. (2001) [KAISO--a new member of the BTB/POZ family specifically binds to methylated DNA sequences]. *Genetika*, **37**, 737-44.
149. Rauch, T.A., Zhong, X., Wu, X., Wang, M., Kernstine, K.H., Wang, Z., Riggs, A.D. and Pfeifer, G.P. (2008) High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 252-7.
150. Razin, A. and Cedar, H. (1991) DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev*, **55**, 451-8.
151. Razin, A., Webb, C., Szyf, M., Yisraeli, J., Rosenthal, A., Naveh-Many, T., Sciaky-Gallili, N. and Cedar, H. (1984) Variations in DNA methylation during mouse cell differentiation in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 2275-9.
152. Riessland, M., Brichta, L., Hahnen, E. and Wirth, B. (2006) The benzamide M344, a novel histone deacetylase inhibitor, significantly increases SMN2 RNA/protein levels in spinal muscular atrophy cells. *Hum Genet*, **120**, 101-10.
153. Riggs, A.D. and Jones, P.A. (1983) 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv Cancer Res*, **40**, 1-30.
154. Rollins, R.A., Haghighi, F., Edwards, J.R., Das, R., Zhang, M.Q., Ju, J. and Bestor, T.H. (2006) Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome Res*, **16**, 157-63.
155. Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kroning, A.K., Karle, K., Monani, U.R. and Sendtner, M. (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol*, **163**, 801-12.
156. Rossoll, W., Kroning, A.K., Ohndorf, U.M., Steegborn, C., Jablonka, S. and Sendtner, M. (2002) Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet*, **11**, 93-105.
157. Rouget, R., Vigneault, F., Codio, C., Rochette, C., Paradis, I., Drouin, R. and Simard, L.R. (2005) Characterization of the survival motor neuron (SMN)

- promoter provides evidence for complex combinatorial regulation in undifferentiated and differentiated P19 cells. *Biochem J*, **385**, 433-43.
158. Saito, A., Yamashita, T., Mariko, Y., Nosaka, Y., Tsuchiya, K., Ando, T., Suzuki, T., Tsuruo, T. and Nakanishi, O. (1999) A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4592-7.
 159. Saxonov, S., Berg, P. and Brutlag, D.L. (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1412-7.
 160. Scheffer, H., Cobben, J.M., Matthijs, G. and Wirth, B. (2001) Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*, **9**, 484-91.
 161. Schrank, B., Gotz, R., Gunnensen, J.M., Ure, J.M., Toyka, K.V., Smith, A.G. and Sendtner, M. (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9920-5.
 162. Singh, J., Salcius, M., Liu, S.W., Staker, B.L., Mishra, R., Thurmond, J., Michaud, G., Mattoon, D.R., Printen, J., Christensen, J. *et al.* (2008) DcpS as a therapeutic target for spinal muscular atrophy. *ACS Chem Biol*, **3**, 711-22.
 163. Sugai, F., Yamamoto, Y., Miyaguchi, K., Zhou, Z., Sumi, H., Hamasaki, T., Goto, M. and Sakoda, S. (2004) Benefit of valproic acid in suppressing disease progression of ALS model mice. *Eur J Neurosci*, **20**, 3179-83.
 164. Sumner, C.J., Huynh, T.N., Markowitz, J.A., Perhac, J.S., Hill, B., Coovert, D.D., Schussler, K., Chen, X., Jarecki, J., Burghes, A.H. *et al.* (2003) Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol*, **54**, 647-54.
 165. Sun, Y., Grimmler, M., Schwarzer, V., Schoenen, F., Fischer, U. and Wirth, B. (2005) Molecular and functional analysis of intragenic SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy. *Hum Mutat*, **25**, 64-71.
 166. Sutcliffe, J.S., Nelson, D.L., Zhang, F., Pieretti, M., Caskey, C.T., Saxe, D. and Warren, S.T. (1992) DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, **1**, 397-400.
 167. Suter, C.M., Martin, D.I. and Ward, R.L. (2004) Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet*, **36**, 497-501.
 168. Sutter, D. and Doerfler, W. (1980) Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 253-6.
 169. Suzuki, M.M. and Bird, A. (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, **9**, 465-76.
 170. Swoboda, K.J., Scott, C.B., Reyna, S.P., Prior, T.W., LaSalle, B., Sorenson, S.L., Wood, J., Acsadi, G., Crawford, T.O., Kissel, J.T. *et al.* (2009) Phase II open label study of valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One*, **4**, e5268.
 171. Tate, P.H. and Bird, A.P. (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, **3**, 226-31.
 172. Tong, J.J., Liu, J., Bertos, N.R. and Yang, X.J. (2002) Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1114-23.
 173. van der Steege, G., Grootsholten, P.M., Cobben, J.M., Zappata, S., Scheffer, H., den Dunnen, J.T., van Ommen, G.J., Brahe, C. and Buys, C.H. (1996)

- Apparent gene conversions involving the SMN gene in the region of the spinal muscular atrophy locus on chromosome 5. *Am J Hum Genet*, **59**, 834-8.
174. Wang, C.H., Xu, J., Carter, T.A., Ross, B.M., Dominski, M.K., Bellcross, C.A., Penchaszadeh, G.K., Munsat, T.L. and Gilliam, T.C. (1996) Characterization of survival motor neuron (SMNT) gene deletions in asymptomatic carriers of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **5**, 359-65.
 175. Wang, L.J., Jin, H.C., Wang, X., Lam, E.K., Zhang, J.B., Liu, X., Chan, F.K., Si, J.M. and Sung, J.J. (2009) ZIC1 is downregulated through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, **379**, 959-63.
 176. Wang, Y., Jorda, M., Jones, P.L., Maleszka, R., Ling, X., Robertson, H.M., Mizzen, C.A., Peinado, M.A. and Robinson, G.E. (2006) Functional CpG methylation system in a social insect. *Science*, **314**, 645-7.
 177. Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M. and Schubeler, D. (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*, **39**, 457-66.
 178. Wirth, B. (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat*, **15**, 228-37.
 179. Wirth, B., Brichta, L., Schrank, B., Lochmuller, H., Blick, S., Baasner, A. and Heller, R. (2006) Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet*, **119**, 422-8.
 180. Wirth, B., Hahnen, E., Morgan, K., DiDonato, C.J., Dadze, A., Rudnik-Schoneborn, S., Simard, L.R., Zerres, K. and Burghes, A.H. (1995) Allelic association and deletions in autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy: association of marker genotype with disease severity and candidate cDNAs. *Hum Mol Genet*, **4**, 1273-84.
 181. Wirth, B., Herz, M., Wetter, A., Moskau, S., Hahnen, E., Rudnik-Schoneborn, S., Wienker, T. and Zerres, K. (1999) Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet*, **64**, 1340-56.
 182. Wirth, B., Schmidt, T., Hahnen, E., Rudnik-Schoneborn, S., Krawczak, M., Muller-Myhsok, B., Schonling, J. and Zerres, K. (1997) De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet*, **61**, 1102-11.
 183. Wirth, B., Tessarolo, D., Hahnen, E., Rudnik-Schoneborn, S., Raschke, H., Liguori, M., Giacanelli, M. and Zerres, K. (1997) Different entities of proximal spinal muscular atrophy within one family. *Hum Genet*, **100**, 676-80.
 184. Wolffe, A.P. and Pruss, D. (1996) Hanging on to histones. Chromatin. *Curr Biol*, **6**, 234-7.
 185. Wolffe, A.P. and Pruss, D. (1996) Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell*, **84**, 817-9.
 186. Yang, W.M., Yao, Y.L., Sun, J.M., Davie, J.R. and Seto, E. (1997) Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J Biol Chem*, **272**, 28001-7.
 187. Yoon, H.G., Chan, D.W., Reynolds, A.B., Qin, J. and Wong, J. (2003) N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell*, **12**, 723-34.

188. Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. and Beppu, T. (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem*, **265**, 17174-9.
189. Young, P.J., DiDonato, C.J., Hu, D., Kothary, R., Androphy, E.J. and Lorson, C.L. (2002) SRp30c-dependent stimulation of survival motor neuron (SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2 beta 1. *Hum Mol Genet*, **11**, 577-87.
190. Young, P.J., Le, T.T., Dunckley, M., Nguyen, T.M., Burghes, A.H. and Morris, G.E. (2001) Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN. *Exp Cell Res*, **265**, 252-61.
191. Zerres, K. and Rudnik-Schoneborn, S. (1995) Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol*, **52**, 518-23.
192. Zhang, H.L., Pan, F., Hong, D., Shenoy, S.M., Singer, R.H. and Bassell, G.J. (2003) Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci*, **23**, 6627-37.
193. Zhou, Q., Atadja, P. and Davidson, N.E. (2007) Histone deacetylase inhibitor LBH589 reactivates silenced estrogen receptor alpha (ER) gene expression without loss of DNA hypermethylation. *Cancer Biol Ther*, **6**, 64-9.

11 Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand zwischen März 2006 und September 2009 am Institut für Humangenetik der Uniklinik in Köln in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Eric Hahnen und unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Brunhilde Wirth. Die Betreuung am Institut für Genetik der Universität zu Köln wurde von Herrn Prof. Dr. Jürgen Dohmen übernommen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Wirth für die Möglichkeit, die Doktorarbeit am Institut für Humangenetik zu absolvieren und für ihre wertvollen Ratschläge und Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Prof. Dr. Dohmen danke ich für seine Bereitschaft, meine Arbeit zu betreuen und Herrn Prof. Dr. Büschges für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Bei Herrn Dr. Eric Hahnen möchte ich mich herzlich für die gute Betreuung der Doktorarbeit und das gute Arbeitsklima bedanken und außerdem dafür, dass er mir den Besuch vieler nationaler und internationaler Kongresse ermöglicht hat.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Humangenetik für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Markus Rießland, der in den letzten 5 Jahren immer Zeit für größere oder kleinere Probleme hatte sowie bei Herrn Sebastian Seufert, auf dessen Hilfe ich mich immer verlassen konnte.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei der Initiative 'Forschung und Therapie für SMA e.V.' sowie bei der DFG für die Bereitstellung der erhaltenen Drittmittel bedanken, ohne die meine Anstellung am Institut für Humangenetik nicht möglich gewesen wäre.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und insbesondere meiner Frau Verena danken, die immer für mich da ist.

12 Anhang

12.1 Abbildungen

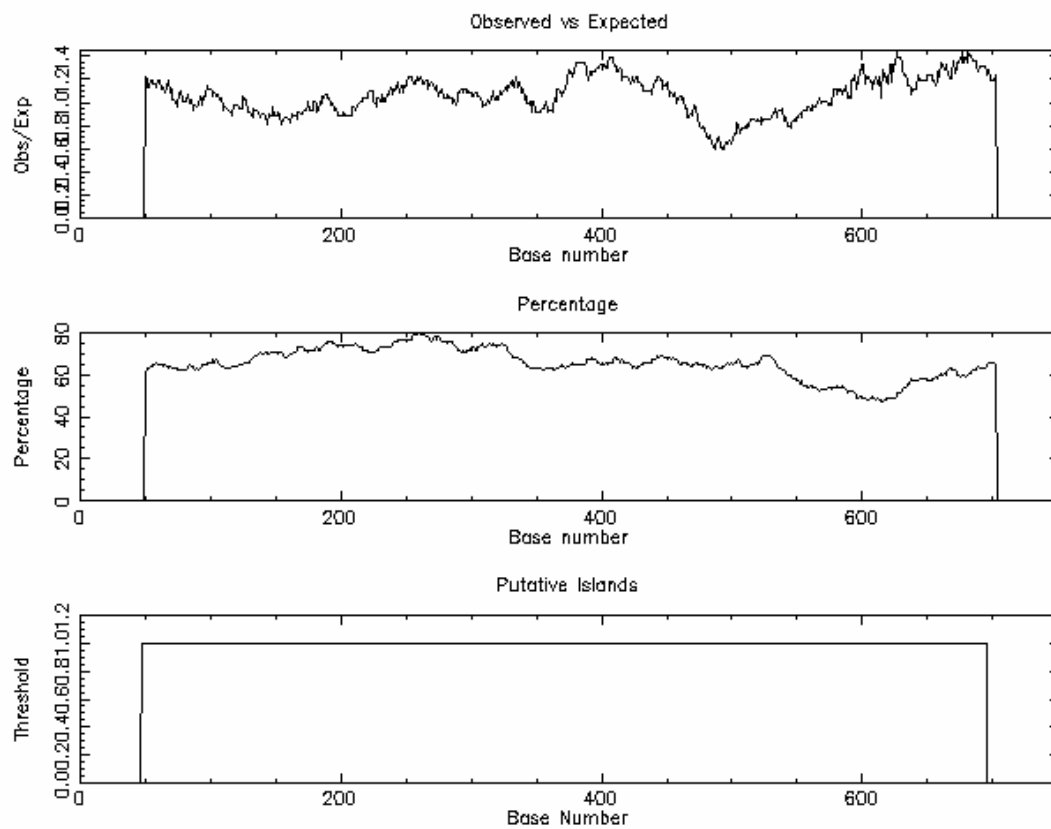


Abbildung 58: CpGplot für den HSV-TK Promotor des pGL4 TK Luziferasevektors. Die Analyse zeigt, dass der gesamte Promotor eine hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden aufweist und damit einer großen CpG-Insel entspricht.

Methylierung der kritischen Region in diskordanten Familien

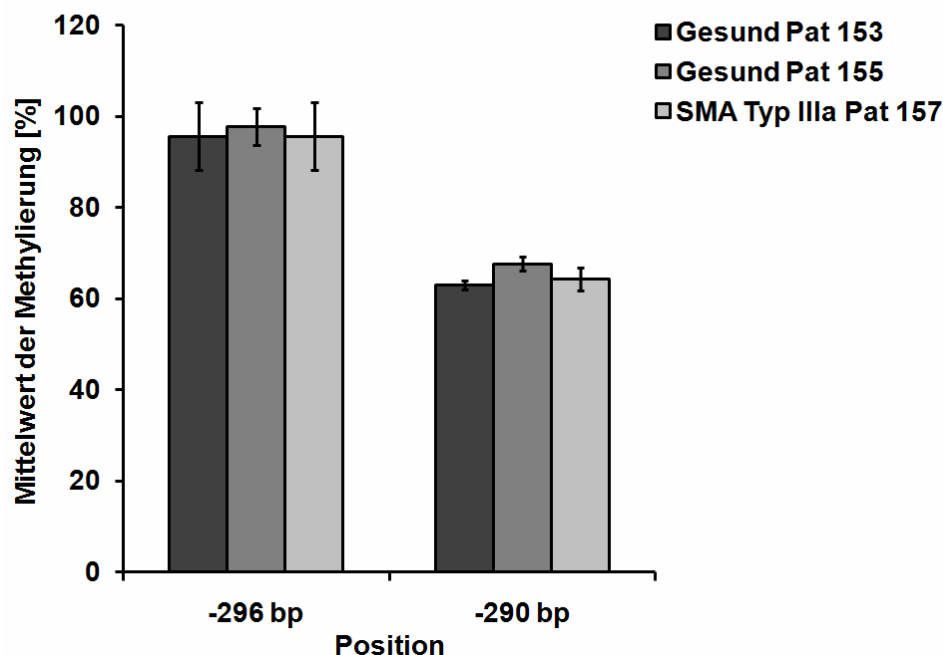


Abbildung 59: Vergleich der Methylierung an den Positionen -296 und -290 im $SMN2$ CGI2 der zweiten untersuchten diskordanten Familie Nr. 34 (n=3). Die zweite untersuchte Familie (Familie Nr. 34) ist beschrieben in (Hahnen, et al. 1995). Hier zeigen drei weibliche Geschwister eine Deletion der Exons 7 und 8 der $SMN1$ Kopien und tragen 3 $SMN2$ Kopien. Eine der drei Schwestern (Pat. 157) ist an einer SMA Typ III a erkrankt (Manifestation im 2.Lebensjahr), während ihre Geschwister (Pat. 153 und 155) nicht betroffen sind. Die Geschwister zeigen an diesen Stellen nahezu identische Methylierungswerte Patient 153 zeigte an Position -296 95,7% ($\pm 7,5\%$) Methylierung an Position -290 nur 63,0% ($\pm 1,0\%$). Für Patient 155 konnten 97,7% ($\pm 4\%$) und 67,7% ($\pm 1,5\%$) gemessen werden, der erkrankte Schwester Patienten 157 zeigte 95,7% ($\pm 7,5\%$) und 64,3% ($\pm 2,5\%$) Methylierung an den untersuchten Positionen. Auch hier zeigte der Vergleich der Methylierung keine signifikanten Methylierungsunterschiede zwischen den gesunden Geschwistern und der erkrankten Schwester.

Methylierung der kritischen Region in diskordanten Familien

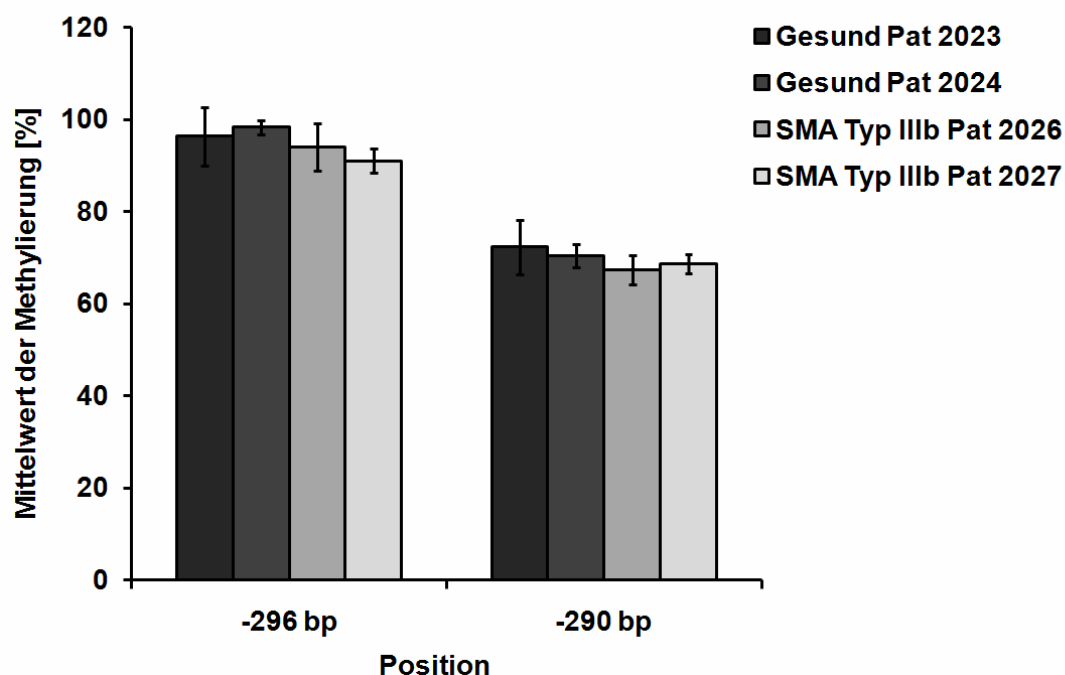


Abbildung 60: Methylierung an den Positionen -296 und -290 der dritten untersuchten diskordanten Familie Nr. 482 (n=3). Die dritte Familie ist ebenfalls beschrieben in (Hahnen, et al. 1995) (Familie 482). Hier weisen ebenfalls alle 4 Geschwister eine Deletion der Exons 7 und 8 der *SMN1* Genkopie auf und tragen 3 *SMN2* Genkopien. Während jedoch die beiden männlichen Geschwister an einer SMA Typ IIIb erkrankt sind, zeigen die beiden Schwestern keine Anzeichen einer Erkrankung. Die Methylierungswerte für die Position -296 betrugen in Patient 2023 96,3% (± 6,4%), Patient 2024 98,3% (± 1,5%), Patient 2026 94,0% (± 5,2%) und Patient 2027 91,0% (± 2,1%). An Position -290 konnten für Patient 2023 72,3% (± 5,9%), für Patient 2024 70,3% (± 2,5%), für Patient 2026 67,3% (± 3,2%) und für Patient 2027 68,7% (± 2,1%) gemessen werden. Auch in dieser Familie konnten keine signifikanten Unterschiede in der CpG Methylierung an den Positionen -290 und -296 festgestellt werden.

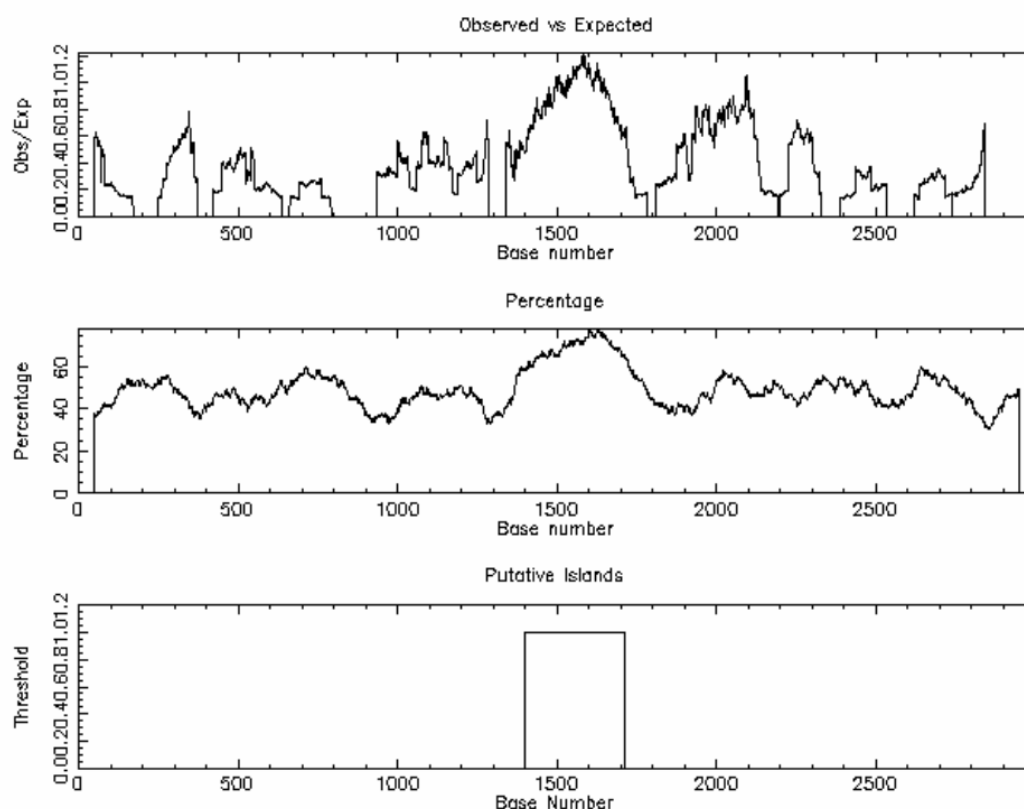


Abbildung 61: CpG-Plot für den murinen *Smn*-Promotor (1500 bp stromaufwärts und stromabwärts vom ATG). Die Analyse mittels CpG-Plot und CpG-Search (www.ebi.ac.uk/Tools/) zeigt nur eine CpG Insel mit einer Größe von 314 bp die das ATG einschließt und von Position -98 bis +215 reicht.

```

Score = 100 bits (110), Expect = 5e-24
Identities = 144/199 (72%), Gaps = 27/199 (13%)
Strand=Plus/Plus

Query 1398 CCTCCCGGCCACCGTACTGTTCCGCTCCCAGAAGCCCCGGGCGGCGGAAGTCGTCACCTCT 1457
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1412 CCTCCGGGCCACCGTACTCTTCCGGTCCCAGAAGCCCCATGA--CGGAAGTCGTCATTG- 1468

Query 1458 TAAGAAGGGACGGGGCCCCACGCTGCGCACCCGCGG--GTTTGCTATGGCGATGAGCAGC 1515
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1469 -----AGTGA-----GCCCG--GCAGCGT--CCGTGGTAGCAGGCCATGGCGATGGGCAGT 1515

Query 1516 GGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCCCGAGCAGGAGGATTCCGTGCTGTTCCGGCGCGGCACA 1575
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1516 GGCGGA-----GCGGGCTCC--GAGCAGGAAGATACGGTGCTGTTCCGGCGTGGCACC 1566

Query 1576 GGCCAGGTGAGGTCGCAGC 1594
          ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1567 GGCCAGGTGAGGTCGCGGC 1585

```

Abbildung 62: Alignment des humanen *SMN*-Promotorbereichs und des murinen *Smn* Promotorbereichs (1500 bp stromaufwärts und stromabwärts vom ATG) mittels BLAST Align2Sequences (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). Der Vergleich zeigt in dem Bereich 202 bp stromaufwärts und 94 bp stromabwärts vom *SMN2* ATG 73% Homologie mit dem murinen Gen. Die Übereinstimmung in den übrigen Bereichen war geringer.

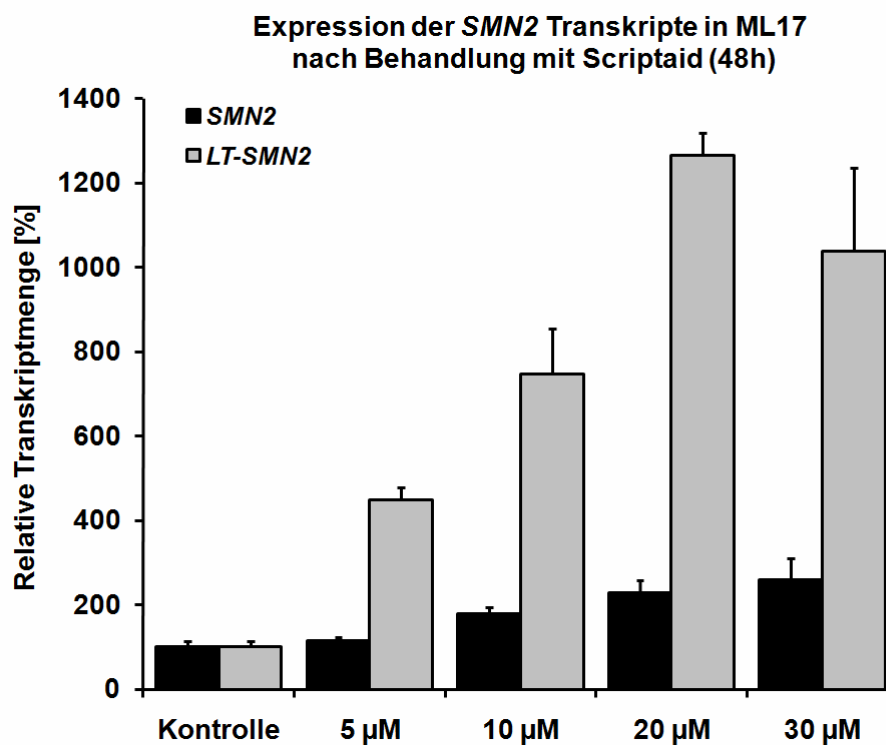


Abbildung 63 Expression der *SMN2*-Transkripte in der Zelllinie ML17 nach Behandlung mit Scriptaid für 48 Stunden. Die Behandlung mit diesem HDAC-Inhibitor führt zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der *LT-SMN2* und *SMN2*-Transkriptmenge. Dabei konnte die *LT-SMN2*-Menge durch die Behandlung mit 20 µM auf das zwölfwache gesteigert werden, die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge hingegen nur verdoppelt werden.

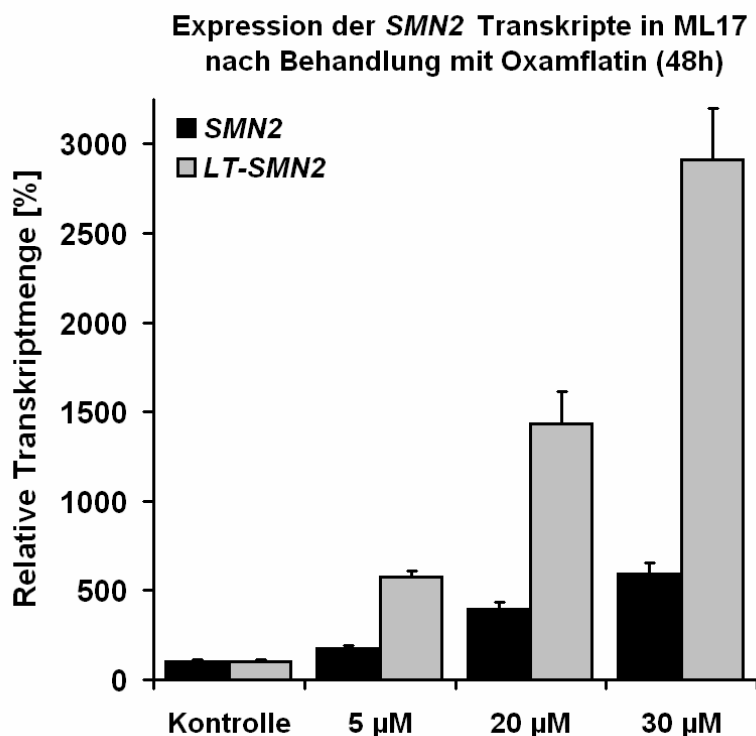


Abbildung 64: Expression der *SMN2*-Transkripte in der Zelllinie ML17 nach Behandlung mit Oxamflatin für 48 Stunden. Die Behandlung mit diesem HDAC-Inhibitor führt ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der *LT-SMN2*- und *SMN2*-Transkriptmenge. Dabei konnte die *LT-SMN2*-Menge durch die Behandlung mit 30 µM nahezu 30fach gesteigert werden (2909% +290% / -264%), und die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge um 490% (+73% / -65%) gesteigert werden.

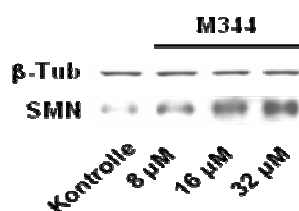


Abbildung 65: Exemplarischer Western Blot des SMN-Proteins in Proteinextrakten aus den OHSCs von Patient P8 nach der Behandlung mit M344 für 48h. Die Mittelwerte der Quantifizierung von 3 Westernblotanalysen zeigte eine konzentrationsabhängige Steigerung der SMN-Proteinmenge relativ zu β -Tubulin. Die Behandlung mit 8 µM führte zu einer Erhöhung auf 138% ($\pm 2\%$) im Vergleich zur Kontrolle. Durch eine Wirkstoffkonzentration von 16 µM konnte die SMN-Proteinmenge auf 188% ($\pm 30\%$) gesteigert werden und durch 32 µM M344 sogar auf 219% ($\pm 41\%$).

**Expression der *SMN* Transkripte in humanen OHSCs (H5)
nach Behandlung mit VPA (48h)**

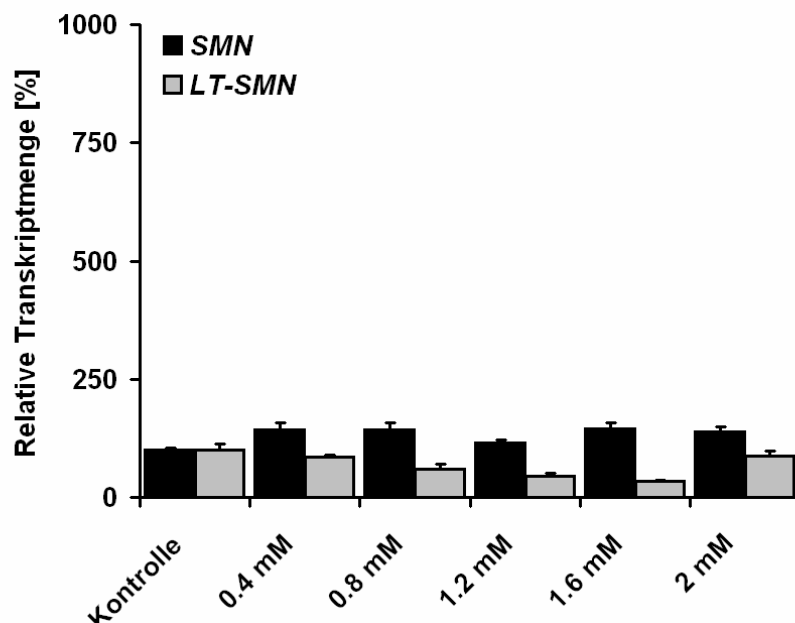


Abbildung 66: Expression der untersuchten *SMN*-Transkripte in Hirnschnitten aus Patient H5 die mit steigenden Konzentrationen VPA für 48 Stunden behandelt wurden. Die Behandlung mit VPA führt nicht zu einer deutlichen Steigerung der *LT-SMN*-Transkriptmenge, die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge konnte bei allen verwendeten Konzentrationen leicht gesteigert werden.

**Expression der *SMN* Transkripte in humanen OHSCs (H6)
nach Behandlung mit VPA (48h)**

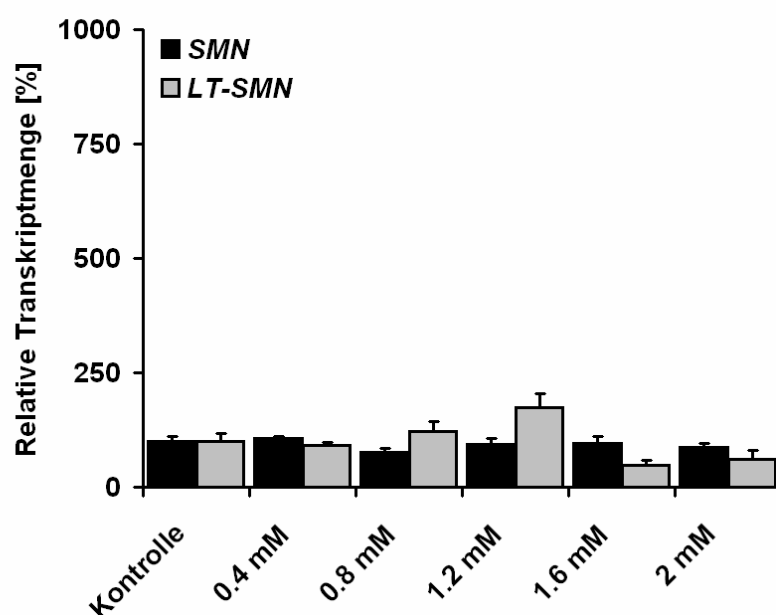


Abbildung 67: Expression der untersuchten *SMN*-Transkripte in Hirnschnitten aus Patient H6 die mit steigenden Konzentrationen VPA für 48 Stunden behandelt wurden. Die *LT-SMN*-Transkriptmenge konnte nur durch die Behandlung mit einer Wirkstoffkonzentration von 1,2 mM leicht erhöht werden die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge blieb unverändert.

Expression der *SMN* Transkripte in humanen OHSCs (P9)
nach Behandlung mit VPA (48h)

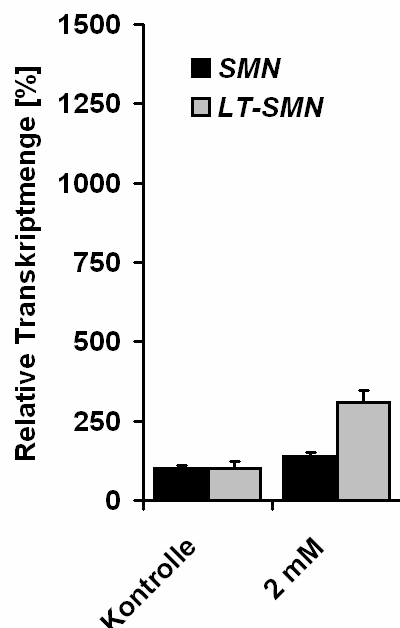


Abbildung 68 Expression der untersuchten *SMN*-Transkripte in Hirnschnitten aus Patient P9 die mit 2 mM VPA für 48 Stunden behandelt wurden. Die *LT-SMN*-Transkriptmenge konnte durch die Behandlung mit dieser Wirkstoffkonzentration auf 307% (+124% / -88%) erhöht werden die *SMN2*-Gesamttranskriptmenge blieb unverändert nahezu unverändert (139% +17% / -15%).

Änderung der Methylierung in *ML17* nach Behandlung Zebularin (48h)

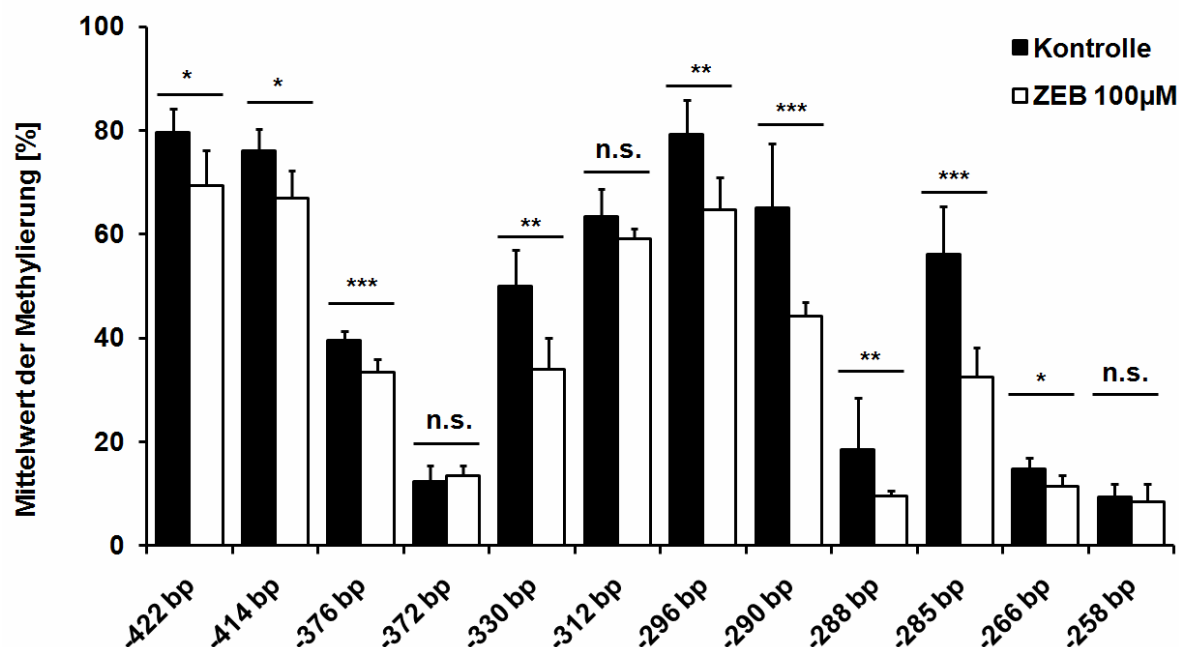


Abbildung 69 *SMN2* CGI2 Methylierungsmusters in der SMA-Fibroblastenzelllinie ML17 nach Behandlung mit Zebularin für 48h. Die Methylierung konnte von 47,0% in der Kontrolle auf 37,3% gesenkt werden. Dabei wurde die Methylierung an 9 der 12 CpG-Dinukleotide signifikant reduziert.

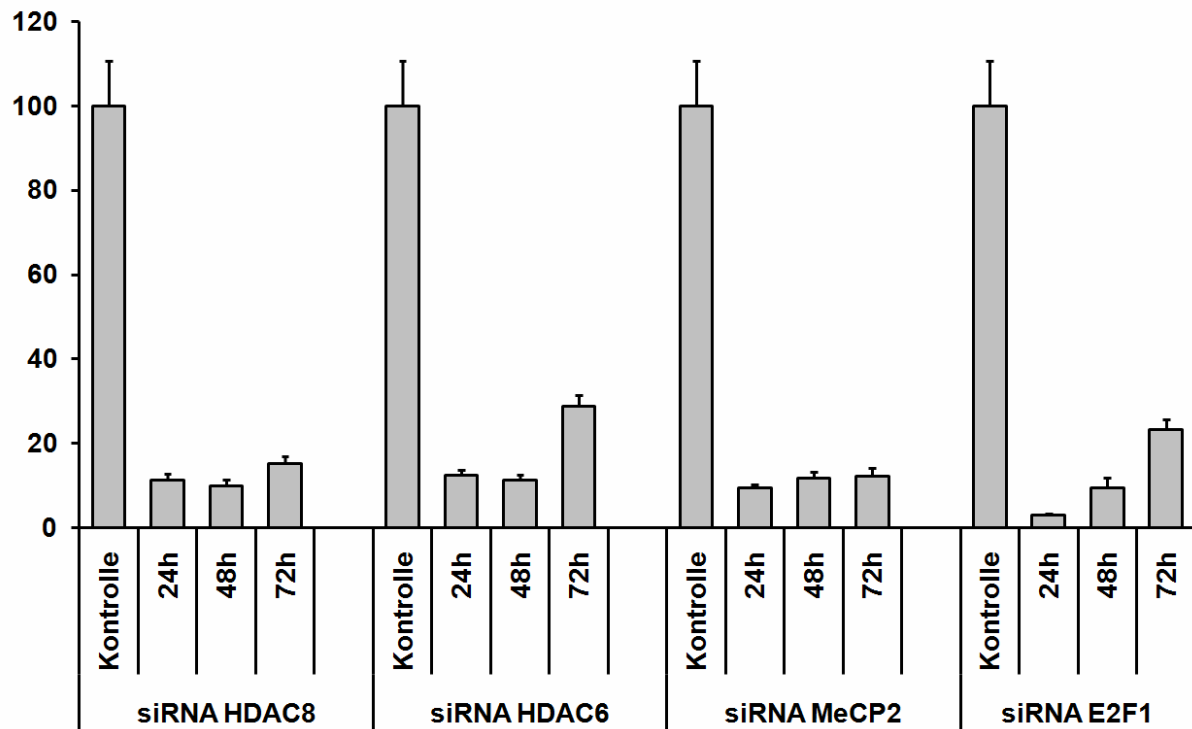


Abbildung 70: Die *knock-down* Effizienz in ML17 nach 24, 48 und 72 Stunden. Die höchste *knock-down* Effizienz konnte für alle untersuchten siRNAs nach 48 Stunden festgestellt werden, daher wurde diese Behandlungsdauer mit den siRNAs für die übrigen Versuche gewählt.

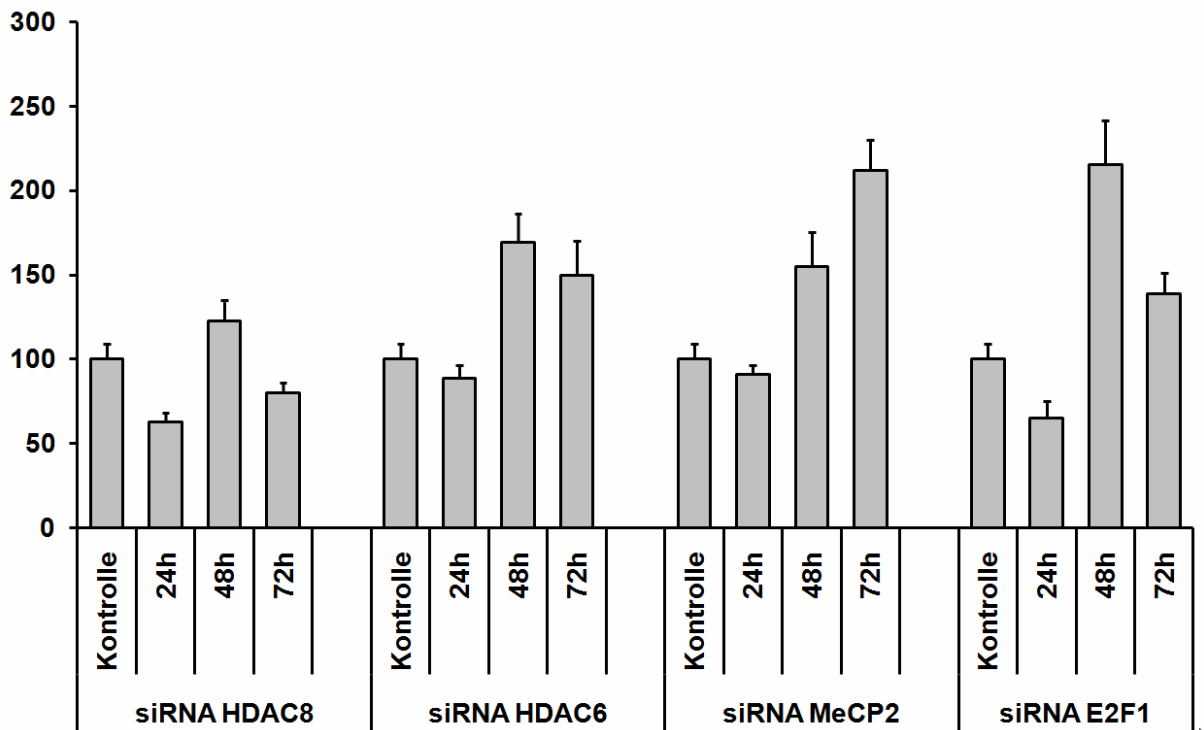


Abbildung 71: *knock-down* in ML17 nach 24, 48 und 72 Stunden. Die *LT-SMN2* Transkriptmengen zeigten bereits nach 48 Stunden deutliche Steigerungen eine längere Inkubationsdauer mit den siRNAs bewirkte nur im Fall von MeCP2 eine weitere Steigerung der *LT-SMN2*-Expression

12.2 Abkürzungsverzeichnis

µg	mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Desoxyadenin
APS	Ammonium-Persulfat
bp	Basenpaar/e
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Desoxycytidin
cDNA	complementary DNA
ddNTPs	Didesoxynukleotidtriphosphate
D-MEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium +4500mg/l Glukose + L-Glutamin +Pyruvat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	Deoxycholsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
et al.	und andere (hier Autoren)
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FKS	fetales Kälberserum
FL-SMN	Volllänge-SMN
fmol	femtomol
G	Desoxyguanosin
h	Stunden
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HRP	Horse Reddish Peroxidase
kDa	Kilodalton

M	Mol pro Liter (molar)
M344	4-Dimethylamino-N-(6-hydroxycarbamoylhexyl)-benzamid
mA	Milliampere
met	methyliert
mg	milligram
min	Minute/Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
NE	Kernextrakte (Nuclear Extracts)
NEB	New England Bio Labs
nt	Nukleotide
OHSCs	organotypische hippocampale Hirnschnittkulturen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNA	Ribonukleinsäure; Ribonucleic acid
RT	Reverse Transkription
SAHA	Suberoylanilide Hydroxam Säure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde/Sekunden
siRNA	small interfering RNA
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMN	survival motor neuron
SMN Δ 7	SMN ohne Exon 7
T	Desoxythymidin
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

TSS	Transkriptionsstartstelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
unmet	unmethyliert
UV	Ultra-Violett
V	Volt
VPA	Valproinsäure

12.3 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation wurde von Prof. Dr. Jürgen Dohmen und Prof. Dr. Brunhilde Wirth betreut.

Teilpublikationen:

Survival motor neuron gene 2 silencing by DNA methylation correlates with spinal muscular atrophy disease severity and can be bypassed by histone deacetylase inhibition

Hauke J., Riessland M, Lunke S, Eyüpoglu IY, Blümcke I, El-Osta A, Wirth B, Hahnen E. Human Molecular Genetics 2009 18(2):304-317; doi:10.1093/hmg/ddn357

Sowie die unter 9.4 aufgeführten gedruckten Kongressbeiträge

Jan Hauke
